

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :

C12N 15/57, 9/64, A61K 38/48

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/38318**

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

3. September 1998 (03.09.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT98/00046

(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Februar 1998 (27.02.98)

(30) Prioritätsdaten:

A 336/97 27. Februar 1997 (27.02.97) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO
AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67,
A-1221 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HIMMELSPACH, Michele
[FR/AT]; Breitstetten 19, A-2285 Leopoldsdorf (AT).
PFLEIDERER, Michael [DE/AT]; Johann-Nestroy-Gasse
12/16, A-2301 Groß Enzersdorf (AT). FALKNER,
Falko-Günter [DE/AT]; Neusiedlzeile 76A, A-2304
Orth/Donau (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gus-
tav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT). DORNER,
Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT).
SCHLOKAT, Uwe [DE/AT]; Hauptstrasse 51, A-2304
Orth/Donau (AT).

(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien
(AT).

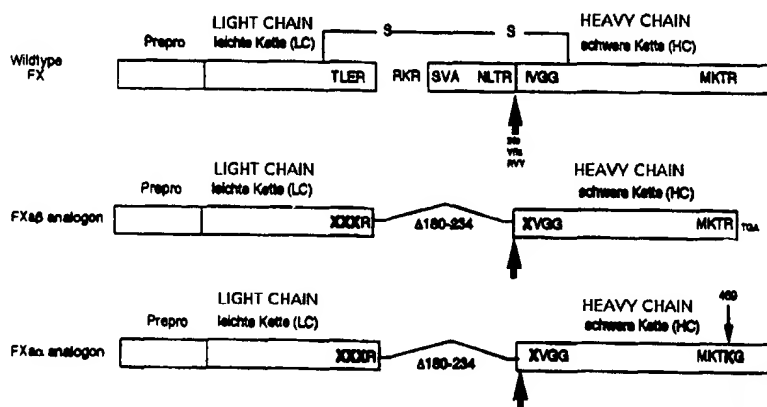
(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, HU, IL, JP, MX, NO,
PL, RU, SI, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: FACTOR X DELETION MUTANTS AND ANALOGUES THEREOF

(54) Bezeichnung: FAKTOR X-DELETIONSMUTANTEN UND ANALOGE DAVON



Oligonucleotidpaare benutzt
zur Klonierung
OLIGNUCLEOTIDE PAIRS
USED FOR CLONING

0003/0004

0005/0006 +0007/0008

(57) Abstract

The invention relates to factor XΔ analogues, comprising a deletion of the amino acids Arg180 to Arg234 and a modification in the region of the amino acid sequence between Gly173 and Arg179. The invention also relates to preparations containing said factor XΔ analogues and methods for the production thereof.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben werden Faktor XΔ-Analoga mit einer Deletion der Aminosäuren Arg180 bis Arg234 und einer Modifikation im Bereich der Aminosäuresequenz zwischen Gly173 und Arg179, Präparationen, enthaltend diese Faktor XΔ-Analoga und Verfahren zu deren Herstellung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Faktor X-Deletionsmutanten und Analoge davon

Die Erfindung betrifft Faktor X Δ -Analogue mit einer Deletion der Aminosäuren Arg180 bis Arg234 und eine Modifikation im Bereich der Aminosäuresequenz zwischen Gly173 bis Arg179, Präparationen enthaltend die erfindungsgemäße Faktor X Δ -Analogue oder Faktor Xa-Analogue, sowie Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge.

Nach Initiierung des Blutgerinnungsprozesses verläuft die Gerinnungskaskade durch die sequentielle Aktivierung von verschiedenen Proenzymen (Zymogenen) im Blut in ihre aktiven Formen, den Serinproteasen. Dazu gehören u.a. Faktor XII/XIIa, Faktor XI/XIa, Faktor IX/IXa, Faktor X/Xa, Faktor VII/VIIa und Prothrombin/Thrombin. Die meisten dieser Enzyme sind im physiologischen Zustand nur aktiv, wenn sie in einem Komplex an einer Membranoberfläche assoziiert sind. Ca-Ionen sind in viele dieser Prozesse involviert. Die Blutgerinnung folgt entweder dem intrinsischen Weg, bei dem alle Proteinkomponenten im Blut vorhanden sind, oder dem extrinsischen Weg, bei dem der Gewebefaktor eine kritische Rolle spielt. Der Wundverschluß erfolgt schließlich durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin.

Der Prothrombinase-Komplex ist verantwortlich für die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin. Thrombin ist ein wichtiges Enzym, das sowohl als Prokoagulant als auch als Antikoagulant wirken kann. Der Prothrombinase-Komplex, an dem u.a. Faktor Va (als Cofaktor) und Faktor Xa (als Serinprotease) beteiligt sind, assembliert in einer Ca-abhängigen Assoziation an der Oberfläche von Phospholipiden. Es wird diskutiert, daß dabei die katalytische Komponente des Prothrombinase-Komplexes Faktor Xa ist.

Faktor X (Stuart/Prower-Faktor) ist ein Vitamin K-abhängiges Koagulationsglykoprotein, das durch die intrinsische und extrinsische Blutgerinnungskaskade aktiviert werden kann. Das primäre Translationsprodukt von Faktor X (pre-pro-FX) besitzt 488 Aminosäuren und wird von der Leber oder humanen Hepatoma-Zellen zunächst als einzelkettiges 75 kD Vorläuferprotein syntheti-

- 2 -

siert. Im Plasma liegt Faktor X weitgehend als zweikettiges Molekül vor (Fair et al., 1984, Blood 64:194-204).

Während der Biosynthese wird nach Abspaltung der pre-Sequenz durch eine Signalpeptidase (zwischen Ser23/Leu24) und des Pro-peptides (zwischen Arg40/Ala41) das einzelkettige Faktor X-Molekül durch Prozessierung und Entfernung des Tripeptides Arg180-Lys181-Arg-182 in die zweikettige Form, bestehend aus der ca. 22 kD leichten Kette und der ca. 50 kD schweren Kette, die miteinander über eine Disulfid-Brücke verbunden sind, gespalten (Figur 1). Faktor X zirkuliert im Plasma daher als zweikettiges Molekül.

Während des Blutgerinnungsprozesses wird Faktor X vom inaktiven Zymogen zur aktiven Protease Faktor Xa durch limitierte Proteolyse konvertiert, wobei die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa in einem von 2 membrangebundenen Komplexen erfolgen kann: dem extrinsischen Faktor VIIa/Gewebefaktor-Komplex oder dem intrinsischen Faktor VIIa-Faktor IXa-Phospholipid-Ca-Komplex oder "Tenase-Komplex" (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185:647-658). Eine proteolytische Spaltung zwischen Aminosäuren Arg 234/Ile 235 führt zur Freisetzung eines 52 Aminosäuren langen Aktivierungspeptids vom N-Terminus der schweren Kette und damit zur Bildung des aktiven Enzyms, Faktor Xa. Das katalytische Zentrum des Faktor Xa ist auf der schweren Kette lokalisiert.

Die Aktivierung über den Faktor VIIa-TF(extrinsischen)-Komplex führt zur Bildung von Faktor Xa α (35 kD) und Faktor Xa β (31 kD), wobei bei geringen Konzentrationen von Faktor VIIa im Komplex auch ein Polypeptid von 42 (kD) auftritt. Die Bildung von Faktor Xa α erfolgt über eine Spaltung bei Arg234/Ile 235 der schweren Kette und repräsentiert die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa. Das Auftreten von Faktor Xa β resultiert vermutlich aus einer autokatalytischen Spaltung bei Arg469/Gly470 im C-Terminus der schweren Kette von Faktor Xa α und der Abspaltung eines 4.5 kD-Peptides. Faktor Xa β besitzt ebenfalls wie Faktor Xa α katalytische Aktivität. Es wurde jedoch gezeigt, daß durch die Spaltung von Faktor Xa α zu Faktor Xa β eine Plasminogen-Rezeptorbindungsstelle entsteht und Faktor Xa β gegebenenfalls fibrinolytische

Aktivität aufweist bzw. an Fibrinolyse als Cofaktor beteiligt ist. Die Umwandlung von Faktor X α zu Faktor X β ist jedoch langsamer als die Bildung von Thrombin, wodurch eine Initiierung der Fibrinolyse vor Ausbildung eines Blutklots verhindert wird (Pryzdial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:16614-16620; Pryzdial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:16621-16626).

Das 42 kD-Polypeptid resultiert aus einer Prozessierung im C-Terminus der schweren Kette zwischen Arg469/Gly470 ohne vorherige Prozessierung zwischen Arg234/Ile 235. Dieses Intermediat besitzt ebenso wie ein Faktor X γ -Fragment, das durch Proteolyse bei Lys370 entsteht, keine katalytische Aktivität (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185:647-658; Pryzdial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:16614-16620).

Die Aktivierung von Faktor X im intrinsischen Weg wird katalysiert durch den Faktor IXa-Faktor VIIIa-Komplex. Während der Aktivierung werden die gleichen Prozessierungsprodukte erhalten, jedoch wird das Faktor X β -Produkt in einem höheren Ausmaß erhalten als andere Faktor X-Prozessierungsprodukte (Jesty et al., 1974, J. Biol. Chem. 249:5614).

In vitro kann Faktor X beispielsweise durch Russell's Viper Venom (RVV) oder Trypsin (Bajaj et al., 1973, J. Biol. Chem. 248:7729-7741) oder gereinigte physiologische Aktivatoren, wie FVIIa/TF-Komplex oder Faktor IXa/Faktor VIIIa-Komplex aktiviert werden (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185:647-658).

Kommerziell erhältliche Faktor X-Produkte aus Plasma enthalten zumeist eine Mischung aus Faktor X α und Faktor X β , da nach Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa in erster Linie Faktor X α entsteht, der in einem autokatalytischen Prozeß wiederum zu Faktor X β gespalten wird.

Um ein einheitliches Faktor Xa-Produkt mit hoher molekularer Integrität herzustellen, wurde in der EP 0 651 054 vorgeschlagen, Faktor X mit RVV über einen längeren Zeitraum zu aktivieren, sodaß das resultierende Endprodukt im wesentlichen Faktor X β enthielt. Sowohl die Nebenprodukte, beispielsweise Faktor

Xa α , als auch die Protease wurden anschließend durch mehrere chromatographische Schritte entfernt.

Die cDNA für Faktor X wurde isoliert und charakterisiert (Leytus et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:3699-3702; Fung et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:3591-3595). Humaner Faktor X wurde in vitro in verschiedenen Zelltypen, wie humanen embryonalen Nierenzellen oder CHO-Zellen exprimiert (Rudolph et al., 1997, Prot. Expr. Purif. 10: 373-378, Wolf et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730). Es wurde jedoch festgestellt, daß bei der rekombinanten Expression von humanem Faktor X die Prozessierung an Position Arg40/Ala41 im Gegensatz zur in vivo-Situation ineffizient erfolgt und unterschiedliche N-Termini an der leichten Kette von Faktor X entstehen (Wolf et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730). Rekombinanter Faktor X (rFX) wurde durch RVV in vitro zu rFaktor Xa (rFXa) aktiviert oder rFXa direkt exprimiert, wobei das Aktivierungspeptid von Aminosäure 183 bis Aminosäure 234 deletiert und durch ein Tripeptid ersetzt wurde, um eine Prozessierung unmittelbar in eine zweikettige rFXa-Form zu ermöglichen. Gereinigter rFX wurde zu etwa 70% in leichte und schwere Kette prozessiert, während die verbleibenden 30% einzelkettigen rFX mit 75 kD darstellten. Direkte Expression von rFXa führte zwar zur Bildung von aktivem Faktor Xa, jedoch auch zu inaktiven Intermediaten. Wolf et al. (1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730) stellten weiterhin eine verringerte Aktivität von rekombinantem Faktor X fest, die sie auf die schlechtere Aktivierbarkeit des rFX durch RVV sowie auf die inaktive Population an Proteinen und Polypeptiden des einzelkettigen Vorläufermoleküls zurückführten. Insbesondere fanden sie eine hohe Instabilität von rFXa bei Expression durch rekombinante Zellen, was sie auf die hohe Autoproteolyse rate zurückführten.

Um die Funktion des C-terminalen Peptides von Faktor Xa α zu untersuchen, führten Eby et al. (1992, Blood 80 (Suppl. 1): 1214 A) ein Stopcodon an Position Gly430 der Faktor X-Sequenz ein. Sie fanden jedoch keinen Unterschied zwischen der Aktivierungsrate von Faktor Xa (FXa α) mit β -Peptid oder einer Deletionsmutante ohne β -Peptid (FXa β).

Faktor Xa ist ein wichtiger Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes und wird daher als primärer Mediator der schnellen Stillung von Blutungen diskutiert, wodurch er geeignet zur Behandlung von Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, beispielsweise bei Hämophilie, erscheint.

Insbesondere die Behandlung von Hämophilie-Patienten mit Faktor VIII- oder Faktor IX-Defizienz mit Faktoren-Konzentraten, hergestellt aus Plasma, wird bei längeren Therapiezeiten oft dadurch kompliziert, daß inhibitorische Antikörper gegen diese Faktoren gebildet werden. Es wurden daher eine Reihe von Alternativen entwickelt, um Hämophilie-Patienten mit Faktoren mit einer Bypass-Aktivität zu behandeln. So wurde die Verwendung von Prothrombin-Komplex-Konzentrat, partiell aktiviertem Prothrombinase-Komplex (APPC), Faktor VIIa oder FEIBA vorgeschlagen. Kommerzielle Präparate mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität (FEIBA) sind beispielsweise FEIBA® oder Autoplex®. FEIBA etwa enthält vergleichbare Einheiten an Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X und FEIBA, geringe Mengen an Faktor VIII und Faktor V, sowie Spuren von aktivierten Koagulationsfaktoren, wie Thrombin und Faktor Xa bzw. einen Faktor mit Faktor X-ähnlicher Aktivität (Elsinger, 1982, Activated Prothrombin Complex Concentrates. Ed. Mariani, Russo, Mandelli, p.77-87). Elsinger weist insbesondere auf die Bedeutung einer "Faktor Xa-like"-Aktivität in FEIBA hin. Faktor VIII-Bypass-Aktivität wurde von Giles et al. (1988, British J. Haematology 9:491-497) für eine Kombination von gereinigtem Faktor Xa und Phospholipiden im Tiermodell gezeigt.

Es besteht daher ein großer Bedarf und eine Reihe von verschiedenen Anwendungsgebieten für Faktor X/Xa oder Faktor X/Xa-ähnlichen Proteinen entweder allein oder als Bestandteil eines Koagulationskomplexes in der Blutstillungstherapie.

Die Halbwertszeit von Faktor Xa ist gegenüber dem Zymogen sowohl in vivo als auch in vitro stark herabgesetzt. So kann etwa Faktor X in Glycerin 18 Monate stabil aufbewahrt werden, während Faktor Xa unter gleichen Bedingungen nur 5 Monate stabil ist (Bajaj et al., 1973, J. Biol. Chem. 248:7729-2241) bzw. in Glycerin bei 4°C nach 8 Monaten eine Reduktion der Aktivität um

- 6 -

mehr als 60% zeigt (Teng et al., 1981, Thrombosis Res. 22: 213-220). Die Halbwertszeit von Faktor Xa beträgt lediglich 30 Sekunden im Serum.

Aufgrund der Instabilität von Faktor Xa wurde vorgeschlagen, Faktor X-Präparate zu verabreichen (US 4,501,731). Bei lebensbedrohenden Blutungen, insbesondere bei Hämophilie-Patienten, ist jedoch eine Verabreichung von Faktor X wirkungslos, da durch das Fehlen des funktionellen "Tenase-Komplexes" im intrinsischen Blutgerinnungsweg keine ausreichende Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa erfolgen kann und die Aktivierung über den extrinsischen Weg oftmals zu langsam erfolgt, um eine rasche Wirkung zu erzielen. Zudem ist bei Hämophilie-Patienten ausreichend Faktor X vorhanden, der jedoch im Vergleich zu Faktor Xa eine 1000fach geringere Prothrombinase-Aktivität besitzt. In solchen Fällen ist es erforderlich, aktivierten Faktor Xa direkt, gegebenenfalls zusammen mit Phospholipiden, wie bei Giles et al. (1988, British J. Haematology 9:491-497) beschrieben oder mit anderen Koagulationsfaktoren, etwa mit Faktor VIII By-pass-Aktivität, zu verabreichen.

Bei der Herstellung von Faktor Xa aus Faktor X erfolgte die Aktivierung bisher zumeist über unphysiologische Aktivatoren tierischen Ursprungs, wie RVV oder Trypsin, wobei jedoch absolut sichergestellt sein mußte, daß das Endprodukt vollständig frei von diesen Proteasen ist. Wie oben schon erwähnt, werden bei der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa eine Vielzahl teilweise auch inaktiver Intermediate gebildet (Bajaj et al., 1973, J. Bio. Chem. 248:7729-7741, Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185: 647-658). Die Anwesenheit solcher Intermediate führt zu einer Erniedrigung der spezifischen Aktivität des Produktes und gegebenenfalls auch zu solchen Intermediaten, die als Antagonisten der aktiven Serinprotease fungieren können. Zur Herstellung eines einheitlichen, reinen Produktes mit hoher spezifischer Aktivität sind daher bei konventionellen Methoden aufwendige Verfahren zur Aktivierung sowie zur chromatographischen Reinigung erforderlich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher eine Präparation

- 7 -

zur Verfügung zu stellen, die ein Polypeptid mit Faktor X/Xa-Aktivität enthält, das eine hohe Stabilität aufweist und das ohne die Verwendung einer der üblichen Proteasen, insbesondere tierischen Ursprungs, wie beispielsweise RVV oder Trypsin, zu Faktor Xa aktiviert werden kann. Ein weiteres Ziel ist es, eine pharmazeutische Präparation mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität bereitzustellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Faktor X-Analogon zur Verfügung gestellt wird, das eine Deletion der Aminosäuren Arg180 bis Arg234 der Faktor X-Aminosäuresequenz aufweist sowie eine Modifikation dieser Faktor X-Deletionsmutante im Bereich der Aminosäuresequenz zwischen Gly173 und Arg179. Durch die Deletion der Aminosäuresequenz von Arg180 bis Arg234 werden sowohl das Tripeptid Arg180 bis Arg182 als auch das Aktivierungspeptid Ser183 bis Arg234 deletiert und es entsteht eine direkte Fusion zwischen leichter und schwere Kette von Faktor X und den Aminosäuren Arg179 und Ile235. Diese Fusionssequenz enthält jedoch keine natürlich vorkommende Spaltstelle für eine Protease. Durch Modifikation des Bereiches der Faktor X-Sequenz zwischen Aminosäure Gly173 und Arg179 und gegebenenfalls von Ile235 wird eine erfindungsgemäße Faktor X-Deletionsmutante erhalten, die eine neue, nicht an dieser Position im Polypeptid vorkommende Erkennungs- bzw. Prozessierungsstelle für eine Protease, die das Polypeptid normalerweise nicht an dieser Stelle spaltet, aufweist. Die Modifikation ist dabei mindestens ein Austausch mindestens einer Aminosäure zwischen Position Gly173 und Arg179 und gegebenenfalls von Ile235 der Faktor X-Aminosäuresequenz. Die Position der Aminosäuren ist dabei bezogen auf die Numerierung gemäß der in Fig. 1 dargestellten Sequenz, beginnend mit Met1 und endend mit Lys488. Für die erfindungsgemäße modifizierte Faktor X-Deletionsmutante wird zur Vereinfachung der Nomenklatur die für die komplette Faktor X-Sequenz vorgegebene Aminosäurennumerierung beibehalten, jedoch wird im weiteren die modifizierte Faktor X-Deletionsmutante als Faktor X Δ -Analogon bezeichnet.

Die Modifikation kann dabei eine Substitution mindestens einer Aminosäure oder eine Insertion einer Peptidsequenz, die eine

Proteaseerkennungs- bzw. Spaltstelle darstellt, sein. Die Modifikation im erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analogon ist dabei vorzugsweise derart, daß sie für eine Protease aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7 (wie in Barr et al., 1991, Cell 66:1-3 oder in der US 5,460,950 beschrieben), der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, eine Erkennungs- bzw. Spaltsequenz darstellt.

Die Modifikation ist vorzugsweise so ausgewählt, daß die Prozessierung durch eine dieser Proteasen zu einem in seiner biologischen Aktivität dem nativen Faktor Xa entsprechenden Polypeptid führt und Faktor Xa-Aktivität aufweist. Um eine optimale Prozessierung zu erreichen, kann es in einzelnen Fällen notwendig sein, zusätzlich die Aminosäure Ile235 auszutauschen. Vorzugsweise sollte die NH₂-terminale Aminosäure Isoleucin der schweren Kette jedoch nach Aktivierung erhalten bleiben, da Isoleucin einer jener Aminosäuren repräsentiert, denen bei der Bildung der Substratbindungstasche eine wesentliche Funktion zukommt (Watzke et al., 1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis, ed. Katherine High & Harold Roberts). Die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge zeigen einen strukturellen Unterschied, insbesondere auf Aminosäure-Ebene im Vergleich zur nativen Faktor X-Sequenz, besitzen jedoch nach Aktivierung eine vergleichbare Aktivität wie natürlich vorkommender Faktor X bzw. Faktor Xa.

Die Erfindung stellt dabei beispielhaft eine Anzahl von Faktor X Δ -Analogen zur Verfügung, die eine Deletion aufweisen und zusätzlich eine Modifikation zwischen Gly173 und Arg179 und gegebenenfalls von Ile235 aufweisen. Modifikationen können an einer oder mehreren Positionen im Bereich zwischen Aminosäure Gly173 und Arg179, und gegebenenfalls Ile235, bezogen auf die Faktor X-Sequenz mit der Numerierung mit Met1 bis Lys 488 gemäß Fig. 1, sein. Aminosäuresubstitutionen können dabei sein an Position Ile 235 (R1), Arg179, Glu178(R2), Leu177 (R3), Thr176 (R4), Gln175 (R5) und Lys174 (R5), wobei jedoch vorzugsweise Arg179 unverändert bleibt.

Die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analogon enthalten vorzugsweise eine Faktor X-Sequenz mit Gly173-R6-R5-R4-R3-R2-Arg179-R1 mit R1= Ile, Val, Ala, Ser oder Thr, R2= Glu, Thr, Pro, Gly, Lys oder Arg; R3= Leu, Phe, Lys, Met, Gln, Ser, Val, Arg oder Pro; R4= Thr, Asn, Asp, Ile, Ser, Pro, Arg oder Lys; R5= Asn, Lys, Ser, Glu, Gln, Ala, His oder Arg und R6= Arg, Asp, Phe, Thr, Leu oder Ser, darstellt.

Bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Faktor X-Analoge sind dabei Faktor X-Analoge, die eine Modifikation aufweisen mit

- a) R1=Ile, R2=Thr, R3=Leu, R4=Asn und gegebenenfalls R5=Asn und/oder R6=Asp und durch Faktor VIIa oder Faktor IXa prozessiert werden;
- b) R1=Val, R2= Thr, R3=Phe, R4=Asp und gegebenenfalls R5=Asn und/oder R6=Phe und/oder R1=Ile oder Val (Fig. 2 A) und durch Faktor XIa prozessiert wird;
- c) R1=Ile oder Val, R2=Phe, R3=Lys, R4=Ile und gegebenenfalls R5=Lys und/oder R6=Thr (Fig. 2 C) oder R1=Ile, R2=Thr, R3=Ser, R4=Thr und gegebenenfalls R5=Lys und/oder R6=Thr (Fig. 2 I) und durch Faktor XIIa prozessiert werden;
- d) R1= Ile oder Val, R2=Thr, R3=Met, R4=Ser und gegebenenfalls R5=Ser und/oder R6=Leu (Fig. 2 D) und durch Kallikrein prozessiert wird;
- e) R1=Ile, R2=Gly, R3=Gln, R4=Pro und gegebenenfalls R5=Lys und/oder R6=Ser (Fig. 2 H) oder R1=Ile, R2=Gly, R3=Glu, R4=Ile (Fig. 2 F) oder R1= Ile, R2=Thr, R3=Lys, R4= Met (Fig. 2 E) und durch Faktor Xa prozessiert werden;
- f) R1=Ile, R2=Lys, R3=Arg, R4=Arg und gegebenenfalls R5=Glu und/oder R6=Leu oder R1=Ile, R2=Thr, R3=Val, R4=Arg und gegebenenfalls R5=Ala und/oder R6=Leu oder R1=Ile, R2=Arg, R3=Val, R4=Arg und gegebenenfalls R5=Gln und/oder R6=Leu oder R1=Ile, R2=Arg, R3=Arg, R4=Arg und gegebenenfalls R5=His und/oder R6=Leu oder R1=Ile, R2=Lys, R3=Pro, R4=Arg und gegebenenfalls R5=Asn

- 10 -

und/oder R6=Leu oder

R1=Ile, R2=Lys, R3=Arg, R4=Ile und gegebenenfalls R5=Arg
und/oder R6=Leu oder

R1=Ile, R2=Lys, R3=Ser und R4=Arg oder

R1=Ile, R2=Thr, R3=Val und R4=Arg oder

R1=Ile, R2=Lys, R3=Leu und R4=Arg (siehe alle Fig. 2 G),
wobei die unter f) genannten Sequenzen durch eine bibasische
Endoprotease, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2,
PC4, PACE 4, LPC/PC7 oder einem Derivat dieser Proteasen pro-
zessiert werden.

Eine mögliche Auswahl von Modifikationen und Aminosäureaustau-
schern, die zu einer veränderten Proteasespezifität führen sind
in Fig. 2 gezeigt.

Die Modifikationen können dabei beispielsweise durch gerichtete
in vitro-Mutagenese oder PCR oder andere aus dem Stand der Tech-
nik bekannte gentechnische Methoden durchgeführt werden, die da-
zu geeignet sind, spezifisch eine DNA-Sequenz zu verändern, um
gezielt Aminosäurenaustausche auszuführen.

Die Aktivierung des erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analogon zu
einem Faktor Xa-Analogon erfolgt gemäß der vorliegenden Erfin-
dung daher vorzugsweise durch eine Protease, ausgewählt aus der
Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE,
PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa
Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa,
Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Pro-
teasen.

Die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge liegen als einzelkettige
Polypeptide in einer enzymatisch inaktiven Form vor. Erst durch
Spaltung durch eine Protease in die zweikettige Form wird akti-
ves Faktor Xa-Analogon erhalten. Die Modifikation erlaubt daher
eine Aktivierung des inaktiven, einzelkettigen Faktor X Δ -Analo-
gon-Polypeptids in die zweikettige, aktive Form.

Eine der Schwierigkeiten bei der Herstellung von aktivem Faktor
Xa ist seine Instabilität, da durch Autokatalyse neben Faktor

Xa α und Faktor Xa β auch andere, inaktive Intermediate entstehen.

Zur Herstellung von im wesentlichen intakten, aktiven Faktor X/Xa- bzw. Faktor X/Xa-ähnlichen Molekülen wäre es daher wünschenswert, nur solche Proteine zu erhalten, die zu stabilen Endprodukten führen.

Es ist bekannt, daß eine bevorzugte Spaltstelle für die Prozessierung von Faktor Xa α (FXa α) zu Faktor Xa β (FXa β) zwischen Arg469/Gly470 liegt. Aufgrund von Untersuchungen von Eby et al., (1992, Blood. Vol. 80, Suppl. 1, 1214) wird neben einem prominenten carboxyterminalen Peptid (Aminosäurereste 476-487) von Faktor X ein weiteres kürzeres Peptid (Aminosäurereste 474 bis 477) gefunden, das durch Autokatalyse von Faktor Xa α entsteht. Um eine gezielte Prozessierung von intaktem Faktor X zu im wesentlichen aktivem Faktor Xa zu focussieren, ohne dabei inaktive Prozessierungs-Intermediate zu erhalten, weisen die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge gegebenenfalls weitere Modifikationen auf.

Die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analogon weisen daher gemäß einer besonderen Ausführungsform eine weitere Modifikation im C-terminalen Bereich der Faktor X-Aminosäuresequenz auf.

Gemäß einer Ausführungsform weist ein Faktor X Δ -Analogon der oben beschriebenen Art ein intaktes β -Peptid (FX Δ a) auf. Die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analogon besitzen dabei insbesondere eine Modifikation im Bereich der C-terminalen β -Peptidspaltstelle, die verhindert, daß nach Aktivierung von Faktor X Δ zu Faktor Xa-Analogon eine Abspaltung des β -Peptids von Faktor X erfolgt. Dadurch wird ein Faktor Xa-Molekül erhalten, das bis zu 100% als intaktes Faktor Xa α -Molekül isoliert werden kann.

Die Modifikation kann eine Mutation, Deletion oder Insertion im Bereich der Faktor X-Aminosäuresequenz zwischen Aminosäureposition Arg469 und Ser476 und gegebenenfalls von Lys370 sein. Bevorzugt ist jedoch eine Aminosäuresubstitution, durch die vermieden wird, daß durch den Aminosäureaustausch eine die Struktur und damit gegebenenfalls die Funktion und Aktivität des Proteins

beeinflussende Faltung des Polypeptides erfolgt.

Gemäß einer Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge einen Austausch einer der Aminosäuren an Position Arg469 und/oder Gly470, wobei Arg 469 vorzugsweise gegen Lys, His oder Ile und Gly470 vorzugsweise gegen Ser, Ala, Val oder Thr ausgetauscht ist.

Die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge können neben einer Mutation an Position Arg469 und/oder Gly470 eine weitere Mutation an Position Lys370 und/oder Lys475 und/oder Ser476 aufweisen. Durch eine Aminosäuresubstitution an dieser(n) Position(en) wird eine Prozessierung von Faktor X α -Analogon zu Faktor X β -Analogon bzw. C-terminal trunkierten Faktor X α -Analogon vermieden, da die natürlicherweise vorkommende(n) Prozessierungssequenz(en) derart modifiziert ist (sind), daß eine gegebenenfalls autokatalytische Abspaltung eines Carboxy-terminalen Peptids nicht mehr erfolgen kann.

Gemäß einer anderen Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoge eine Deletion des carboxyterminalen β -Peptids (FX $\Delta\beta$) auf. Ein solches Faktor X-Analogon kann hergestellt werden, indem eine cDNA kodierend für Faktor X Δ -Analogon in einem rekombinanten Expressionssystem exprimiert wird, wobei nur die Sequenzen kloniert werden, die für die Aminosäuren Met1 bis Arg179/Ile235 bis Arg469 kodieren.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge ein Translationsstoppsignal im C-terminalen Bereich der Faktor X-Sequenz auf. Das Translationsstoppsignal ist dabei vorzugsweise an einer Position, die einer nach natürlicher Prozessierung entstehenden C-terminalen Aminosäure folgt. Das Translationsstoppsignal ist daher vorzugsweise an Position der Aminosäure 470 der Faktor X-Sequenz, damit das endständige Arg469 des Faktor X $\Delta\beta$ erhalten bleibt. Dazu wird das für die Aminosäure Gly470 kodierende Kodon GGC gegen TAA, TAG oder TGA substituiert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Faktor

X Δ -Analoge, die durch Behandlung mit einer entsprechenden Protease in vitro in Faktor Xa-Analogen aktiviert werden, also die aktivierten Faktor X Δ -Analoge. Abhängig vom Faktor X Δ -Analogon, das eingesetzt und aktiviert wird, wird ein Faktor Xa Δ -Analogon erhalten, das am C-terminalen Ende der leichten Kette entsprechende Aminosäure-Modifikationen gegenüber der natürlichen Faktor Xa-Sequenz aufweist. Die Modifikationen sind erfindungsgemäß jedoch so ausgewählt, daß sie die biologische Aktivität nicht beeinträchtigen.

Weist ein solches Faktor X-Analogon gegebenenfalls zusätzlich ein Translationsstoppsignal im C-terminalen Bereich des β -Peptids auf, so werden modifizierte Faktor Xa β -Moleküle gewonnen. Wird jedoch ein Faktor X-Analogon eingesetzt, das Modifikation(en) innerhalb der β -Peptidsequenz aufweist, die dazu führt(en), daß das β -Peptid nicht abgespalten wird, so wird ein Faktor Xa α -Analogon mit einem Aminosäureaustausch im C-Terminus des Moleküls erhalten.

Die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge weisen ausschließlich Modifikationen auf, die die Spezifität für die Aktivierbarkeit ändern und nicht signifikant die Aktivität beeinflussen. Es werden daher in jedem Fall biologisch und funktionell aktive Faktor Xa-Moleküle bzw. Faktor Xa-Analoge gewonnen.

Die Aktivierung in vitro kann durch eine Protease ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, erfolgen. Es liegt jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, jede beliebige Protease, außer RVV oder Trypsin, einzusetzen, sofern sie geeignet ist, das erfindungsgemäße Faktor X Δ -Analogon zu Faktor Xa-Analogen zu prozessieren.

Obwohl beispielsweise von Wolf et al. (1991, J. Biol. Chem. 266:13726-137309) vermutet wurde, daß eine Endopeptidase wie Kex2, Furin oder PACE an der Prozessierung der von dieser Gruppe beschriebenen Faktor Xa-Deletionsmutante beteiligt ist, geben

- 14 -

sie keinerlei Hinweise über den Einfluß einer dieser Proteasen bei der Prozessierung von Faktor X. Ebenso wird in der US 5,660,950 die rekombinante Herstellung von PACE und die Verwendung der Protease zur Verbesserung der Prozessierung von Vitamin-K abhängigen Proteinen beschrieben. In einer Reihe von Aufzählungen mit anderen Blutfaktoren wird auch Faktor X genannt, wobei jedoch diese Aussage verifizierende Daten fehlen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde zum erstenmal eindeutig gezeigt, daß eine der für den Reifungsprozeß von Faktor X notwendige Protease eine bibasische Endoprotease, insbesondere endogen vorkommendes Furin, ist. In vivo vermittelt die Endoprotease in erster Linie die Spaltung des einzelkettigen Faktor X-Moleküls in die reife Form bestehend aus schwerer und leichter Kette. In vitro vermittelt sie zusätzlich die Abspaltung der Faktor X Pro-Peptid-Sequenz (Beispiel 2).

Gemäß einer besonderen Ausführungsform wird ein Faktor X Δ -Analogon bereitgestellt, das vorzugsweise in gereinigter Form als einzelkettiges Molekül vorliegt. Faktor X Δ -Analoge, die im modifizierten Bereich eine Schnittstelle für eine in rekombinanten Zellen nicht vorkommende Protease aufweisen, werden nach Expression als einzelkettiges Molekül erhalten. Das einzelkettige Faktor X Δ -Molekül zeichnet sich insbesondere durch seine hohe Stabilität und molekulare Integrität aus. Bisher konnte ein einzelkettiges, inaktives Faktor X Δ -Molekül nicht in gereinigter Form isoliert werden, da es in rekombinanten Zellen in Faktor Xa und eine Reihe von weiteren, auch inaktiven, Intermediaten prozessiert wird (Wolf et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730). Das isolierte einzelkettige Faktor X Δ -Analogon kann durch spezifische Prozessierung direkt in die zweikettige Faktor Xa-Analogon-Form aktiviert werden. Dies kann dadurch erfolgen, daß ein aus einer rekombinanten Zelle isoliertes einzelkettiges Faktor X Δ -Molekül mit einer die im Faktor X Δ -Analogon befindliche Aktivierungsstelle spaltenden Protease in Kontakt gebracht wird. Wird etwa ein Faktor X Δ -Analogon mit einer Furin-Aktivierungsstelle in einer Furin-defizienten Zelle exprimiert, so kann es als einzelkettiges Faktor X Δ -Analogon isoliert und durch Inkontakt-bringen mit einer bibasischen Protease, wie Furin/PACE

- 15 -

oder Kex2 in aktives, zweikettiges Faktor X Δ a-Analogon prozessiert werden. Faktor X Δ -Analoge mit einer Prozessierungsstelle für eine Serinprotease oder Kallikrein können auch in Furin-exprimierenden Zellen als einzelkettiges Molekül isoliert und anschließend mit der Serinprotease in aktives Faktor Xa-Analogon prozessiert werden.

Ein derart erhaltenes Faktor Xa-Analogon weist aufgrund der selektiven und gerichteten Prozessierungsreaktion eine hohe Stabilität und strukturelle Integrität auf und ist insbesondere frei von inaktiven Faktor X/Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Abbauprodukten.

Das erfindungsgemäße Faktor X Δ -Analogon wird gemäß der vorliegenden Erfindung sowohl in Form eines Faktor X Δ a mit intaktem β -Peptid als auch in Form eines Faktor X Δ -Analogon mit einer Deletion des β -Peptids zur Verfügung gestellt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die rekombinante DNA kodierend für die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge. Die rekombinante DNA resultiert nach Expression in einem Faktor X Δ -Analogon mit einer Aminosäuresequenz entsprechend dem humanen Faktor X, außer einer Deletion der Aminosäuren von Arg180 bis Arg234 und einer Modifikation, die eine Prozessierung und Aktivierung in aktiven Faktor Xa-Analogon, sowohl mit intaktem als auch deletiertem β -Peptid, ermöglicht.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Präparation enthaltend ein gereinigtes Faktor X Δ -Analogon, das eine Deletion der Aminosäuren von Arg180 bis Arg234 und einer Modifikation der Aminosäuren im Bereich zwischen Gly173 und Arg179 und gegebenenfalls von Ile235 aufweist. Die Modifikation führt dabei zu einer neuen, nicht-natürlicherweise an dieser Position im Polypeptid vorkommenden Erkennungs- bzw. Spaltstelle für eine Protease, die das Polypeptid normalerweise nicht an dieser Stelle prozessiert. Die Präparation kann dabei eine gereinigte Präparation enthaltend einzelkettiges Faktor X Δ -Analogon sein, wobei die Polypeptide aus einem Zellkultursystem entweder nach Isolierung aus dem Zellkulturüberstand oder aus einem Extrakt einer Zellkultur er-

- 16 -

halten werden. Ein aus einem Zellkultursystem vorgereinigtes rekombinantes Faktor X Δ -Analogon kann über aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren weiter gereinigt werden. Dazu eignen sich insbesondere chromatographische Verfahren, wie Gelfiltration, Ionenaustauscher- oder Affinitätschromatographie.

Gemäß einer Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Präparation das Faktor X Δ -Analogon als einzelkettiges Molekül in enzymatisch inaktiver Form, wobei das Faktor X Δ -Analogon mit einer Reinheit von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 90%, besonders bevorzugt von mindestens 95% vorliegt, und in der gereinigten Präparation keine inaktiven, proteolytischen Intermediate von Faktor X/Xa-Analogon enthalten sind.

Gemäß einem besonderen Aspekt enthält die Präparation einzelkettiges Faktor X Δ -Analogon mit einer Modifikation, die eine Aktivierung zu Faktor Xa-Analogen durch eine der Protease, ausgewählt aus der Gruppe der bibasischen Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen erlaubt. Die Aktivierung erfolgt dabei durch In-Kontakt-bringen des Faktor X Δ -Analogons mit der entsprechenden Protease, die bei der modifizierten Sequenz spaltet, wodurch ein Faktor Xa-Analogen erhalten wird.

In der erfindungsgemäßen Präparation kann das Faktor X Δ -Analogon entweder als Faktor X $\Delta\alpha$ (FX $\Delta\alpha$) mit intaktem β -Peptid oder mit einer Deletion des β -Peptids als Faktor X $\Delta\beta$ oder anderer C-terminalen Deletionen vorliegen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Präparation das Faktor X Δ -Analogon vorzugsweise als einzelkettiges Molekül in isolierter Form. Dazu wird beispielsweise durch rekombinante Herstellung Faktor X Δ -Analogon als einzelkettiges Molekül mit einer Modifikation, die eine Aktivierung zu Faktor Xa-Analogon in vitro erlaubt, gewonnen. Die Aktivierung von Faktor X Δ -Analogon zu Faktor Xa-Analogon kann dabei erfolgen durch In-Kontakt-bringen des Faktor X-Analogons mit einer Prote-

- 17 -

ase, ausgewählt aus der Gruppe der bibasischen Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen. Die Protease kann dabei an einen Träger immobilisiert sein.

Die erfindungsgemäße Präparation kann als Ausgangsmaterial zur Herstellung und Gewinnung von Faktor Xa-Analogen dienen. Dazu wird in einem großtechnischen Ansatz die Präparation, enthaltend einzelkettiges Faktor XA-Analogon mit einer gegebenenfalls immobilisierten Protease unter Bedingungen, die eine optimale Aktivierung von Faktor XA-Analogon zu Faktor Xa-Analogon erlauben, in Kontakt gebracht und Faktor Xa-Analogon erhalten. Das so gewonnene Faktor Xa-Analogon kann anschließend über allgemein bekannte Methoden gereinigt und zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung mit Faktor Xa-Aktivität formuliert werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Präparation, enthaltend ein Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, das insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X/Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Abbauprodukten, bereitgestellt und das dadurch erhältlich ist, daß ein Faktor XA-Analogon der oben beschriebenen Art aktiviert und zu einer entsprechenden Präparation zubereitet wird.

Gemäß einer besonderen Ausführung enthält die Präparation, enthaltend das gereinigte, einzelkettige oder zweikettige Faktor XA-Analogon, einen physiologisch akzeptablen Träger und ist gegebenenfalls als pharmazeutisches Präparat formuliert. Die Formulierung kann in an sich üblicher Weise erfolgen und mit einem Puffer, enthaltend Salze, wie NaCl, CaCl₂, und Aminosäuren, wie Glycin und/oder Lysin, bei einem pH im Bereich von 6 bis 8 gemischt und als pharmazeutisches Präparat formuliert sein. Die gereinigte Präparation, enthaltend Faktor X-Analogon kann als fertige Lösung, Lyophilisat oder tiefgefroren bis zum Endgebrauch als lagerfähiges Produkt bereitgestellt werden. Vorzugsweise erfolgt die Lagerung der Präparation in lyophilisierter

Form und wird mit einer entsprechenden Rekonstitutionslösung in eine optisch klare Lösung gelöst.

Die Präparation gemäß der vorliegenden Erfindung kann jedoch auch als Flüssigpräparat bzw. in flüssig-tiefgefrorener Form zur Verfügung gestellt werden.

Die erfindungsgemäße Präparation ist besonderes stabil, d.h. sie kann auch in gelöster Form über längere Zeit vor der Applikation stehen gelassen werden. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße Präparation für mehrere Stunden bis Tage keinerlei Aktivitätsverlust zeigt.

Die erfindungsgemäße Präparation kann in einer geeigneten Vorrichtung, vorzugsweise einer Applikationsvorrichtung, in Kombination mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, vorliegen.

Die erfindungsgemäße Präparation, enthaltend ein Faktor X Δ -Analogon in Kombination mit einer Protease, die in der Lage ist, das Faktor X Δ -Analogon zu Faktor Xa-Analogon zu aktivieren, kann als Kombinationspräparat bereitgestellt werden, bestehend aus einem Behälter enthaltend eine an einen Träger immobilisierte Protease, gegebenenfalls in Form einer Mini-Säule oder einer mit einer immobilisierten Protease bestückten Spritze und einem Behälter enthaltend die pharmazeutische Präparation mit Faktor X Δ -Analogon. Zur Aktivierung des Faktor X Δ -Analogons wird die Faktor X Δ -Analogon-haltige Lösung beispielsweise über die immobilisierte Protease gedrückt. Die Faktor X Δ -Analogon haltige Lösung ist dabei während der Lagerung des Präparates vorzugsweise von der immobilisierten Protease räumlich getrennt. Die erfindungsgemäße Präparation kann im gleichen Behälter wie die Protease sein, wobei die Komponenten jedoch durch eine impermeable Trennwand, die bei etwaigem Gebrauch leicht zu entfernen ist, räumlich getrennt sind. Die Lösungen können auch in eigenen Behältern aufbewahrt werden und erst kurz vor Anwendung miteinander

in Kontakt gebracht werden.

In einer besonderen Ausführungsform ist die zur Aktivierung eingesetzte Protease eine natürlicherweise bei der Blutgerinnung beteiligte Serinprotease, wie etwa Faktor XIIa, die dann vor der Applikation nicht vom aktivierten Faktor Xa-Analogon abgetrennt werden muß, sondern mit ihm appliziert werden kann.

Die Aktivierung von Faktor X Δ -Analogon zu Faktor Xa-Analogon kann kurz vor dem direkten Gebrauch, also vor der Applikation am Patienten erfolgen. Die Aktivierung kann durch In-Kontakt-bringen mit einer immobilisierten Protease oder durch Mischen von Lösungen, enthaltend einerseits eine Protease und andererseits Faktor X Δ -Analogon, erfolgen. Es ist daher möglich, die beiden Komponenten getrennt voneinander in Lösung zu halten und durch eine geeignete Vorrichtung, bei der die Komponenten während des Durchlaufs in Kontakt kommen, zu mischen, wodurch Faktor X Δ -Analogon zu Faktor Xa-Analogon aktiviert wird. Dem Patienten wird so ein Gemisch von Faktor Xa und einer weiteren Serinprotease, die die Aktivierung bewirkt hat, verabreicht werden. Hierbei ist insbesondere auf die Dosierung zu achten, da durch die zusätzliche Gabe einer Serinprotease auch endogener Faktor X aktiviert wird und damit die Gerinnungszeit verkürzt sein kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die pharmazeutische Präparation in einer geeigneten Vorrichtung, vorzugsweise einer Applikationsvorrichtung, entweder in flüssig-gefrorener oder lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt. Eine geeignete Applikationsvorrichtung kann dabei ein gemäß der AT 366 916 oder der AT 382 783 beschriebener Doppelkammerspritzenkörper sein.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung enthält die erfindungsgemäße Präparation gegebenenfalls als weiteren Bestandteil einen Blutfaktor in Form des Zymogens oder einer aktiven Serinprotease. Bevorzugt sind dabei als weitere Bestandteile solche Komponenten mit FEIB-Aktivität. Dazu gehören insbesondere Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor VIII, Faktor V und/oder die aktiven Serinproteasen davon. Weitere Bestandteile können jedoch auch Phospholipide, Ca-Ionen u.a. sein. Gemäß einer besonderen

Ausführungsform der Erfindung enthält die erfindungsgemäße Präparation mindestens eine weitere Komponente mit FEIB-Aktivität.

Die erfindungsgemäße Präparation kann als pharmazeutische Präparation mit Faktor Xa-Aktivität als Einkomponenten-Präparat oder in Kombination mit anderen Faktoren als Mehrkomponentenpräparat zur Verfügung gestellt werden.

Vor der Aufbereitung in eine pharmazeutische Präparation wird das gereinigte Protein den üblichen Qualitätskontrollen unterzogen und in eine therapeutisch verabreichbare Form gebracht. Insbesondere wird bei der rekombinanten Herstellung das gereinigte Präparat auf Abwesenheit von zellulären und vom Expressionsvektor stammenden Nukleinsäuren getestet, vorzugsweise gemäß einem Verfahren, wie es in der EP 0 714 987 beschrieben ist.

Da prinzipiell jedes biologische Material mit infektiösen Keimen kontaminiert sein kann, wird zur Herstellung eines sicheren Präparates die Präparation gegebenenfalls zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung einer Präparation der oben beschriebenen Art zur Herstellung eines Arzneimittels. Ein Arzneimittel, enthaltend ein erfindungsgemäßes Faktor X Δ -Analogon und entsprechend aktiviertes Faktor X-Analogon, eignet sich insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, wie etwa Hämophilie-Patienten oder Patienten, welche inhibierende Antikörper gegen das verabreichte Therapeutikum entwickelt haben, z.B. gegen Faktor VIII oder Faktor IX.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung des Faktor X Δ -Analogon und eine Präparation, enthaltend das erfindungsgemäße Faktor X Δ -Analogon. Dazu wird die für das Faktor X Δ -Analogon kodierende Sequenz in ein geeignetes Expressionssystem eingebracht und entsprechende Zellen mit der rekombinanten DNA transfiziert. Vorzugsweise werden permanente Zelllinien etabliert, die Faktor X Δ -Analogon exprimieren. Die Zellen werden unter optimalen Bedingungen für die Genexpression

kultiviert und Faktor X-Analoge entweder aus einem Extrakt einer Zellkultur oder dem Zellkulturüberstand isoliert. Das rekombinante Molekül kann durch alle bekannten chromatographischen Verfahren, wie Anionen- oder Kationenaustauscher-, Affinitäts- oder Immunaффinitätschromatographie, oder einer Kombination davon, weiter gereinigt werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge wird die komplette für Faktor X kodierende cDNA in einen Expressionsvektor kloniert. Dies erfolgt entsprechend allgemein bekannten Klonierungstechniken. Die für Faktor X kodierende Nukleotidsequenz wird anschließend derart modifiziert, daß die für die Aminosäuren Arg180 bis Arg234 kodierenden Sequenzen deletiert und Aminosäuren im Bereich zwischen Gly173 und Arg179, gegebenenfalls Ile235 derart verändert werden, daß ein Faktor X Δ -Molekül der oben beschriebenen Art hergestellt werden kann. Dies erfolgt durch aus dem Stand der Technik bekannte gentechnische Methoden, wie gerichtete in vitro-Mutagenese, Deletion von Sequenzen, beispielsweise durch Restriktionsverdau durch Endonukleasen und Insertion anderer veränderter Sequenzen, oder durch PCR. Die so hergestellten Faktor X Δ -Mutanten werden dann in ein für die rekombinante Expression geeignetes Expressionssystem inseriert und exprimiert.

Die erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge können ebenfalls durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die Faktor X Δ -Analoge werden vorzugsweise durch rekombinante Expression hergestellt. Die gentechnische Herstellung kann mit allen gängigen Expressionssystemen, wie z.B. permanenten Zelllinien oder viralen Expressionssystemen, erfolgen. Die permanenten Zelllinien werden hergestellt durch stabile Integration der Fremd-DNA in das Wirtszellchromosom von z.B. Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hep1, insbesondere Leber- und Nierenzellen, oder durch einen episomalen Vektor, abgeleitet von z.B. Papilloma Virus. Virale Expressionssysteme, wie beispielsweise Vaccinia Virus, Baculovirus oder retrovirale Systeme können ebenfalls eingesetzt werden. Als Zelllinien werden allgemein Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hep1, Drüsen-, Leber- und Nierenzellen einge-

setzt. Als eukaryotische Expressionssysteme können auch Hefen, endogene Drüsen (z.B. Drüsen transgener Tiere) und andere Zelltypen verwendet werden. Natürlich können auch transgene Tiere zur Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide oder Derivaten davon verwendet werden. Zur Expression der rekombinanten Proteine haben sich im speziellen CHO-DHFR⁻-Zellen bewährt (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:4216-4220, 1980).

Zur rekombinanten Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analoge können auch prokaryontische Expressionssysteme eingesetzt werden. Hierzu eignen sich insbesondere Systeme, die eine Expression in E. coli oder B. subtilis erlauben.

Die Faktor X Δ -Analoge werden in den entsprechenden Expressionssystemen unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors exprimiert. Im Fall der Expression in Eukaryonten eignen sich dazu alle bekannten Promotoren, wie SV40-, CMV-, RSV-, HSV-, EBV-, β -Actin-, hGH oder induzierbare Promotoren wie z.B. hsp- oder Metallothionein-Promotor. Vorzugsweise werden die Faktor X-Analoge unter Kontrolle des β -Actin-Promotors in CHO-DHFR⁻-Zellen exprimiert.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung umfaßt das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation die Schritte: Bereitstellen einer für ein Faktor X Δ -Analogon kodierenden DNA, Transformation einer Zelle mit der rekombinanten DNA, Expression des Faktor X-Analogons, gegebenenfalls in Gegenwart einer Protease, Isolieren des Faktor X-Analogons und gegebenenfalls Reinigung über ein chromatographisches Verfahren.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens wird das Faktor X Δ -Analogon direkt als zweikettiges Molekül isoliert. Dazu wird ein Faktor X Δ -Analogon, das eine Modifikation aufweist, die eine Prozessierung durch eine bibasische Protease wie Furin erlaubt, in einer Zelle exprimiert und das Faktor X Δ -Analogon in zweikettiges Faktor X Δ -Analogon prozessiert. Die Zelle ist dabei vorzugsweise eine Zelle, die eine für die Prozessierung fähige Protease, etwa eine bibasische Protease, wie Furin oder ein Derivat davon, exprimiert. Gegebenenfalls kann zur Erhöhung bzw. Verbes-

serung der Prozessierungseffizienz die Zelle derart modifiziert werden, daß sie die Protease verstärkt exprimiert. Dies kann beispielsweise durch Co-Expression einer entsprechenden bibasischen Endoprotease, etwa Furin/PACE, Kex2 oder einem Derivat davon erfolgen. Das erfindungsgemäße Faktor X Δ -Analogon kann ebenfalls in einer Zelle exprimiert werden, die eine normale oder damit für die Prozessierung suboptimale endogene Konzentration einer Protease aufweist und demzufolge eine unvollständige Prozessierung in die zweikettige aktive Form stattfindet. Die anschließende Prozessierung zu Faktor Xa-Analogon erfolgt in diesem Fall, sofern einkettiges Faktor X-Analogon in den Zellkulturüberstand sezerniert wird, wie oben beschrieben, durch Co-Kultivierung mit Protease-exprimierenden Zellen oder In-Kontaktbringen mit einer, gegebenenfalls immobilisierten, Protease. Der Zellüberstand kann auch über eine Trägermatrix, an die eine Protease gebunden ist, gepumpt werden, wodurch im Eluat zweikettiges Faktor Xa-Analogon erhalten wird.

Das so erhaltene Faktor Xa-Analogon kann anschließend isoliert, gereinigt und bis zur weiteren Verwendung, wie oben beschrieben, gegebenenfalls als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert und stabil gelagert werden. Die Reaktionsbedingungen für die Prozessierungsreaktion und die Aktivierung können ohne weiteres vom Fachmann je nach Versuchsanordnung der gegebenen Rahmenbedingungen optimiert werden. Dabei ist für die Kontaktdauer die Fließgeschwindigkeit der vorliegenden Reaktanden von besonderer Bedeutung. Diese sollte zwischen 0,01 ml/min und 1 ml/min liegen. Als weitere Parameter sind Temperatur, pH-Wert und Elutionsbedingungen von Bedeutung. Nach dem Durchlauf kann Faktor Xa-Analogon gegebenenfalls über selektive Chromatographie weiter gereinigt werden. Die Durchführung des Verfahrens mit jeweils an einen Träger gebundener Protease ist deshalb von besonderem Vorteil, da die Reaktionsanordnung durch Verwendung eines Trägers, vorzugsweise von Chromatographiesäulen, einen zusätzlichen Reinigungsschritt ermöglicht.

Gemäß einer Ausführungsform erfolgt die Aktivierung durch einen chromatographischen Schritt, bei dem die Protease an einen Träger immobilisiert ist. Gereinigtes einzelkettiges Faktor X Δ -Ana-

logon wird dazu über eine Matrix, an die die Protease gebunden ist, geleitet und aus dem Eluat gereinigtes Faktor Xa-Analogon isoliert.

Gemäß einem Aspekt der Erfindung wird eine Präparation, enthaltend aktives Faktor Xa-Analogon, dadurch erhalten, daß ein wie oben beschrieben hergestelltes Faktor X Δ -Analogon einem Prozessierungs-/Aktivierungsschritt unterzogen wird und das aktivierte Polypeptid zu einer gereinigten Präparation, die gegebenenfalls als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert ist, weiterverarbeitet wird.

Gemäß einem weiteren Aspekt zur Herstellung eines Präparates, enthaltend einzelkettiges Faktor X Δ -Analogon, wird etwa das Faktor X Δ -Analogon, das eine Prozessierungssequenz für eine bibasische Protease aufweist, in einer Zelle exprimiert, die eine Endoprotease-Defizienz aufweist. Die Zelle weist dabei vorzugsweise eine Defizienz einer bibasischen Endoprotease, wie etwa Kexin, Furin, PACE oder homologe Derivate davon auf. Aus einer solchen Endoprotease-Defizienten-Mutantenzelle kann Faktor X Δ -Analogon als einzelkettiges Molekül isoliert werden. Faktor X Δ -Analoge, die eine Prozessierungsstelle für eine Serinprotease aufweisen, können in jeder herkömmlichen Zelle, auch Furin-positiven Zelle, exprimiert werden und als einzelkettiges Molekül isoliert werden.

Ein derart isoliertes und gegebenenfalls gereinigtes Faktor X-Analogon wird anschließend mit einer Protease ausgewählt aus der Gruppe der Endoprotease, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, in Kontakt gebracht, unter Bedingungen unter denen einzelkettiges Faktor X-Analogon zu Faktor Xa-Analogon gespalten und aktiviert wird.

Mit den erfindungsgemäßen Faktor X Δ -Analogon, die durch einen, wie oben beschriebenen, Prozess zu Faktor Xa-Analogon aktiviert werden, wird gereinigtes Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität

- 25 -

und struktureller Integrität und insbesondere frei von inaktiven Faktor X/Xa-Intermediaten, gewonnen.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren näher beschrieben, wobei sie jedoch nicht auf diese besonderen Ausführungsbeispiele beschränkt ist.

Beispiel 1 beschreibt die Konstruktion und Expression eines rFaktor X; Beispiel 2 beschreibt die Prozessierung von rFaktor X in schwere und leichte Kette durch Furin; Beispiel 3 beschreibt die Prozessierung von pro-Faktor X mittels immobilisierter Protease; Beispiel 4 beschreibt die Aktivität des in vitro prozessierten rFaktor X; Beispiel 5 beschreibt die Expression von rFaktor X in Furin-defizienten Zellen; Beispiel 6 beschreibt die Konstruktion und Expression von rFaktor X Δ -Analogen; Beispiel 7 beschreibt die Bestimmung der N-Termini der Faktor X-Prozessierungsprodukte; Beispiel 8 beschreibt die Expression und Charakterisierung des FX-Analogon mit der Stelle Arg-Val-Thr-Arg/Ile (rFX Δ RVTR/I); Beispiel 9 beschreibt die in vitro-Aktivierung des rFX Δ RVTR/I-Proteins durch rFurin-Derivate.

Es zeigen:

- Figur 1: Nukleotid-und Aminosäuresequenz von Faktor X
- Figur 2: Schematische Darstellung der Faktor X Δ -Analoge mit modifizierten Proteasen-Schnittstellen
- Figur 3: Schematische Darstellung des Expressionsvektors phAct-rFX
- Figur 4: Westernblot-Analyse von rFaktor X exprimiert in CHO-Zellen vor und nach Amplifikation
- Figur 5: Westernblot-Analyse von rFaktor X nach in vitro-Spaltung mit Furinderivaten
- Figur 6: Westernblot-Analyse von rFaktor X-Molekülen exprimiert in Furin-haltigen und Furin-defizienten Zellen
- Figur 7: Schematische Darstellung der rFaktor X Δ -Analogon-Konstrukte mit veränderten C-Termini der schweren Kette
- Figur 8: Schematische Darstellung der N-Termini der rFaktor X-Prozessierungsprodukte aus CHO-, CHO/rFurin und Furin-defizienten Zellen

Figur 9: Westernblot-Analyse von rFaktor λ RVTR/I, exprimiert in CHO-Zellen

Figur 10: Westernblot-Analyse von rFaktor λ RVTR/I nach in vitro-Aktivierung mit Furinderivat.

Die Expressionsvektoren wurden mittels Standard-Klonierungstechniken (Maniatis et al., "Molecular Cloning"- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, US, 1983) hergestellt. Die Herstellung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erfolgte durch allgemeine Methoden (Clackson et al., 1991, PCR A practical approach. ED. McPherson, Quirke, Taylor, S. 187-214).

B e i s p i e l 1 :

Expression und Prozessierung von einzelkettigem rFX zu rFX leichte/schwere Kette

a. Herstellung des rFX-Expressionsvektors

Zur Herstellung von rekombinantem FX (rFX) wurde die cDNA von FX aus einer humanen Leber Lambda-cDNA-Bank, wie von Messier et al. beschrieben (1991, Gene 99:291-294), isoliert. Aus einem positiven Klon wurde mittels PCR mit Oligonukleotid #2911 (5'-ATTACTCGAGAAGCTTACCATGGGCGCCCACTG-3') (SEQ. ID. Nr. 1) als 5'-Primer und Oligonukleotid #2912 (5'-ATTACAATTGCTGCAGGGATCCAC-3') (SEQ. ID. Nr. 2) als 3'-Primer ein DNA-Fragment amplifiziert, das die 1,467kB FX-kodierende Sequenz sowie 39bp der 3'-nicht-translatierten Region, flankiert von einer XhoI-Schnittstelle, am 5'-Ende und einer MfeI-Schnittstelle am 3'-Ende enthält. Zusätzlich wurde durch den Primer #2911 die Sequenz ACC vor das ATG des FX eingebaut, so daß eine optimale Kozak-Translations-initiations-Sequenz entsteht. Anschließend wurde dieses PCR-Produkt als XhoI/MfeI-Fragment in den mit SalI und EcoRI geschnittenen Expressionsvektor phAct kloniert. Das resultierende Expressionsplasmid wurde mit phAct-rFX bezeichnet (Figur 3). Der Expressionsvektor phAct umfaßt den humanen beta-Actin-Promoter, 78bp 5'UTR sowie das Intron, eine multiple Klonierungsschnittstelle und die SV40-Polyadenylierungsstelle.

b. Expression von rFX in CHO-Zellen

Zur Etablierung einer stabilen rFX-exprimierenden Zelllinie wurden dhfr-defiziente CHO-Zellen mit dem Expressionsplasmid phAct-rFX und dem Selektionsmarkerplasmid pSV-dhfr co-transfiziert. Für alle weiteren Expressions- und Funktionsanalysen wurden die Zellkulturen mit serumfreiem Selektionsmedium in Anwesenheit von 10 µg/ml Vitamin K 24 Stunden lang inkubiert. Die Expression von rFX in den resultierenden Zellklonen wurde anhand der Antigenmenge (ELISA, Asserachrom, Boehringer Mannheim) nachgewiesen und das rekombinante Protein anschließend mit SDS-PAGE charakterisiert (Figur 4 A und B). In den Initialklonen und Subklonen davon liegt, wie im Western Blot erkennbar (Figur 4 A), das rekombinante FX-Protein in der Form einer leichten Kette (LC) von 22kD und einer schweren Kette (HC) von ca. 50 kD vor, die identisch mit dem plasmatischen Faktor X-Protein sind. Zusätzlich ist eine Proteinbande bei 75kD zu erkennen, die dem einzelkettigen (SC)-Molekül entspricht und deren Präsenz in FX-transfizierten CHO-Zellen (Wolf et al., J. Biol. Chem. 266:13726-13730, 1991) sowie in humanem Plasma (Fair et al., Blood 64:194-204, 1984) beschrieben wurde. Zur Herstellung von hochexprimierenden Klonen wurden die Initialklone mit steigenden Mengen Methotrexat amplifiziert und anschließend bis zur Stabilisierung subkloniert. Die Expression konnte von ca. 200-500 ng/10E6 Zellen bzw. 1 µg/ml auf 78 µg/10E6 Zellen bzw. 120 µg/ml pro 24 Stunden gesteigert werden. Die Western Blot-Analyse dieser hochexprimierenden Zellklonüberstände (Figur 4 B und Figur 5 A Spur 2) zeigt eine Anreicherung des einzelkettigen rFX-Moleküls sowie die Anwesenheit zusätzlicher Formen der leichten Kette. Neben der 22kD-Form der leichten Kette, die der plasmatischen Form entspricht (vollständig carboxyliert und ohne Propeptid), liegen drei weitere Varianten der leichten Kette mit ca. 21kD, 22,5kD und 20kD vor. Die Heterogenität der leichten Kette in diesen Klonen konnte mittels einer N-terminalen Sequenzierung des rekombinanten Materials auf eine unvollständige Abspaltung des Propeptids (hier: ca. 50% des rFX-Materials) sowie auf Unter-carboxylierung (hier: ca. 50% des rFX) zurückgeführt werden. Das 21kD-Protein ist eine untercarboxylierte Propeptid-haltige und das 20kD-Protein eine untercarboxylierte Propeptid-freie Form

der leichten Kette, während die 22,5 kD-Bande die vollständig carboxylierte, jedoch Pro-Peptid-haltige LC-Form repräsentiert.

B e i s p i e l 2 :

Prozessierung von einzelkettigen rFX in rFX leichte/schwere Kette durch rFurin-Derivate

Aufgrund der Ähnlichkeit der Spaltstellen zwischen Faktor X Propeptid/N-Terminus der leichten Kette (RVTR↓A) und zwischen leichter/schwerer Kette (RRKR↓S) mit der Furin-Konsensus-Erkennungssequenz (RXK/RR↓X) bestand die Möglichkeit, die Prozessierung sowohl einzelkettiger als auch Propeptid-haltiger rFX-Moleküle durch rFurin-Derivate in vitro zu verbessern. In der Literatur werden für die beiden Prozessierungsschritte Proteasen vermutet, bei denen es sich jedoch nicht um Furin handelt (Rehemtulla et al., 1992, Blood 79:2349-2355; Wallin et al., 1994, Thromb. Res. 1994: 395-403).

Zellkulturüberstände von CHO-rFX und CHO-rFurin Δ TM6xHis (Patentanmeldung EP 0 775 750) sowie CHO-rFX und nicht-transfizierten CHO (als Negativkontrolle) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 37°C inkubiert. Aliquote der Reaktionsansätze wurden vor Inkubation (t=0) und nach verschiedenen Inkubationszeiten (t=2, 4, 6 Stunden) mittels Western Blot-Analyse auf prozessierten rFX getestet (Figur 5). Der Nachweis von rFX in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels eines anti-humanen FX-Antiserums (Figur 5 A) bzw. eines monoklonalen Antikörpers spezifisch für die leichte Kette des FX (Figur 5 B).

Im Gegensatz zu dem CHO-rFX/CHO-Gemisch weist das CHO-rFX/CHO-rFurin schon nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C (Figur 5 A Spur 7; Figur 5 B Spur 8) eine fast vollständige Prozessierung vor. Einzelkettiger rFX ist zum Großteil in die leichte und schwere Kettenform umgesetzt. Im Bereich der leichten Kette wurden nur noch die prozessierten Propeptid-freien Formen von 22kD (carboxylierte Form) und 20kD (untercarboxylierte Form) in einem Verhältnis von ca. 50:50 gefunden. Durch Optimieren der Zellkulturbedingungen kann dieses Verhältnis zugunsten der carboxylierten Form verbessert werden. Die korrekte Abspaltung der Pro-Se-

quenz zwischen Arg-1 und Ala+1 und die Homogenität des N-Terminus der leichten Kette wurde mittels N-terminaler Sequenzierung festgestellt. Im Kontrollexperiment, in dem CHO-rFX mit CHO-Überständen gemischt wurde, ist auch nach einer 6-stündigen Inkubation keine Veränderung des rFX-Bandenmusters zu erkennen (Fig. 5A, Spur 5; Figur 5B, Spur 6). Damit wurde nachgewiesen, daß rFurin im Überstand von CHO-Zellen biologisch aktiv ist und sowohl die Prozessierung des Propeptids als auch der schweren/leichten Kette von rFX durchführen kann.

B e i s p i e l 3 :

Prozessierung von Faktor X mittels an Chelat-Tentakelgel-immobilisiertem rFurin

Um festzustellen, ob ein Substrat durch ein Säulen-gebundenes rFurin-Derivat gespalten werden kann, wurde untersucht, ob als Säulen-Matrix statt Ni^{2+} -NTA-Agarose in einem experimentellen Ansatz Fractogel EMD®-Tentakelgel (Fa. Merck) verwendet werden kann. Da die Metallionen hierbei im Vergleich zur Ni^{2+} -NTA-Agarose räumlich weiter von der eigentlichen Säulen-Matrix entfernt sind, könnte eine verbesserte sterische Zugänglichkeit des gebundenen rFurin-Derivats ermöglicht werden. In dem vorliegenden Ansatz wurde Pro-Faktor X durch Tentakelgel gebundenes rFurin-Derivat prozessiert:

Das Fractogel EMD®-Tentakelgel wurde nach Herstellervorschrift mit Ni^{2+} -Ionen beladen und mit frischem Serum-freien Zellkulturmedium equilibriert. Anschliessend wurde die Säule mit Serum-freiem CHO-rFurin-Derivat-Überstand beladen. Waschschriffe erfolgten durch Serum-freies Zellkulturmedium, enthaltend steigende Imidazol-Konzentrationen bis 40mM. Anschliessend wurde Pro-Faktor X als Serum-freier CHO-Überstand über die Säule geleitet. Mittels Western Blot-Analyse mit spezifischem Faktor X-Antiserum wurde die Prozessierung von Pro-Faktor X zu zweikettigem Faktor X im Durchfluß der Säule nachgewiesen.

B e i s p i e l 4 :

Aktivität des in vitro prozessierten rekombinanten Faktor X

Rekombinanter Faktor X-Vorläufer wurde mit und ohne rFurin bei 4°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und bei -20°C weggefroren. Nach Abschluß der Inkubation (nach 4 Tagen) wurden alle Proben mittels FX-Coatest Kit (Fa. Chromogenix) auf FX-Aktivität getestet. Dazu wurden 50 µl von jedem Überstand mit 50 µl FX-defizientem, humanen Plasma versetzt und laut Protokoll des Herstellers rFX mit Schlangengift (RVV) in Anwesenheit von CaCl₂ zu rFXa umgesetzt; rFXa hydrolysiert anschließend das chromogene Substrat (S-2337) und führt zur Freisetzung des gelbfarbigen Paranitroanilins. Da die Menge an rFXa und die Farbtintensität proportional zueinander sind, kann anhand einer Eichgerade, interpoliert aus Werten einer Plasma-Verdünnungsreihe, die Menge zu rFXa aktivierbarem rFX/ml-Zellkulturüberstand bestimmt werden. Mit diesen Ergebnissen und der bekannten rFX-Antigenmenge (ELISA-Daten) kann der Anteil von zu Faktor Xa aktiviertem rFaktor X in % ausgerechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Um unspezifische, proteolytische Aktivität in CHO- und CHO-rFurin-Überständen auszuschließen, wurde das Gemisch dieser beiden Zellkulturüberstände ebenso untersucht.

CHO-rFX inkubiert mit CHO-Überständen (ohne rFurin) als Kontrolle zeigte auch nach 4 Tagen keine wesentliche Änderung der rFXa-Aktivität, die aufgrund der experimentellen Schwankungen bei etwa 800 mU/ml lag und 50 % - 60 % funktionellem rFX entsprach. Wurde im Vergleich dazu CHO-rFX mit CHO-rFurin inkubiert, so entstand während der Inkubationszeit eine konstante Steigerung der rFX-Aktivität, die von etwa 60 % (Zeitpunkt T=0) auf 86 % stieg (Tabelle 1). Damit wurde nachgewiesen, daß durch in vitro-Prozessierung von CHO-rFX aus hochexprimierenden Klonen mittels rFurin-Derivat der Anteil von zu funktionellem rFXa aktivierbaren rFX wesentlich verbessert wird.

Tabelle 1

| | Inkubation in Tagen | Aktivität in mU | Antigen Menge in $\mu\text{g/ml}$ | Funktioneller Anteil an rFX in % |
|------------------------|------------------------|--------------------|---|--|
| CHO-rFX+ CHO | 0 | 814 | 14 | 58 |
| | 1 | 847 | 14 | 61 |
| | 2 | 835 | 14 | 60 |
| | 3 | 790 | 14 | 56 |
| | 4 | 763 | 14 | 55 |
| CHO-rFX+ CHO-rFurin | 0 | 853 | 14 | 61 |
| | 1 | 1018 | 14 | 73 |
| | 2 | 1099 | 14 | 79 |
| | 3 | 1135 | 14 | 81 |
| | 4 | 1198 | 14 | 86 |
| CHO + CHO-rFurin | | 0 | | |
| Plasma FX 500mU | | 585 | | |

B e i s p i e l 5 :**Expression von rekombinantem Faktor X in Furin-defizienten Zellen**

Wie in den vorangegangenen Beispielen gezeigt, wird bei dem Faktor X-Vorläuferprotein sowohl die Propeptid-Abspaltung als die Spaltung der Einzelkette zu leichter/schwerer Kette in vitro durch Furin vermittelt. Dies legt nahe, daß diese Schritte auch in der Zelle endogen durch das ubiquitär vorkommende Furin, abhängig von der jeweilig exprimierten rFaktor X Menge mit unterschiedlicher Effizienz, bewerkstelligt werden. Dies wiederum führt zur Produktion einer Mischung heterogener rFaktor X-Formen.

Eine Möglichkeit, um eine möglichst homogene und zudem stabile Form von rFaktor X-Molekülen zu erzeugen, ist die Spaltung von rFaktor X durch endogene Proteasen, insbesondere Furin, zu unterbinden und somit funktionell inaktiven rFaktor X-Vorläufer (welche durch spätere Downstream-Prozessierung, idealerweise direkt vor Verwendung, in seine funktionell aktive Form umgewandelt werden kann) zu produzieren.

Dieses Verfahren wird speziell bei der Erzeugung von FX-Deletionsmutanten, die eine Furin-Spaltstelle anstatt der ursprünglichen Aktivierungsstelle enthalten, nützlich sein. Bei diesen Konstrukten kann die Aktivierung solch einer rekombinanten rFX-Mutante in vivo durch das endogene Furin stattfinden und zur Sekretion von aktivierten instabileren rFX-Formen führen. Die Degradation dieser Formen, durch CHO-Proteasen, z.B. in Zellkulturbedingungen mit hoher Zellyse, während der Lagerung der Zellkulturüberstände oder dem Reinigungsverfahren, könnte zu inaktiven Abbauprodukten führen (Wolf et al., 1991).

Dieses Ziel kann z.B. durch Supplementieren des Zellkulturmediums mit Agenzien, die die intrazelluläre Furin-Aktivität reduzieren bzw. ausschalten kann, erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist, a priori Furin-defiziente Zellen zu verwenden (Möhring et al., 1983, Infect. Immun. 41:998-1009; Ohnishi et al., 1994, J. Virol. 68:4075-4079; Gordon et al., 1995, Infect. Immun. 63:82-87).

Hierfür wurde ein Furin-defizienter CHO-Zellklon FD11 (Gordon et al., 1995, Infect. Immun. 63:82-87) mit 20 µg phAct-FX und 1 µg pUCSV-neo (enthaltend das Neomycin-Resistenzgen im pUC-Vektor unter der Kontrolle des SV40-Promotors) co-transfiziert. Um stabile Klone zu erhalten, wurde das Medium mit 0,8 µg G418/ml supplementiert. Bei Vergleich sezernierter rFaktor X-Moleküle in serumfreien Überständen eines Furin-haltigen und eines Furin-defizienten CHO-Klons zeigt sich im Westernblot, daß in den Furin-defizienten Zellen rFaktor X-Vorläufer-Prozessierung unterbleibt und nur einzelkettiger Faktor X-Vorläufer vorliegt (Fig. 6); im Gegensatz dazu wird rFaktor X von "normalen" Zellen bei modester Expression noch vollständig, jedoch bei höherer Expression, trotz endogenem Furin, nur noch sehr beschränkt prozessiert. Aufgrund des geringen rFX-Expressionsgrades des verwendeten Zellklons ist die leichte Kette von rFaktor X im Blot hier nicht zu sehen.

- 33 -

Beispiel 6 :

Herstellung von Faktor X Δ -Analogen (derzeit nach Ansicht der Anmelderin der beste Weg zur Ausführung der Erfindung)

6.1. Konstruktion von Expressionsplasmiden zur Herstellung von FX-Deletionsmutanten

Die Faktor X-Deletionsmutanten unterscheiden sich von der Faktor X-Wildtypsequenz durch die Deletion von den ca. 4,5 kDa großen Aktivierungspeptiden zwischen Aminosäure 180 bis 234). Zusätzlich wurden durch Mutagenese in dem C-Terminus der leichten Kette und/oder dem N-Terminus der schweren Kette verschiedene Spaltstellen eingebaut, die zur Aktivierung des daraus entstehenden einzelkettigen Faktor X-Moleküls zum aktivierten Polypeptid dienen. Die Expressionsplasmide für diese Faktor X-Deletionsmutanten sind alle von phAct-FX (beschrieben im Beispiel 1) abgeleitet.

Um die Klonierung der Faktor X-Deletionsmutanten zu vereinfachen, wurde das HindIII-NaeI DNA-Fragment aus Plasmid phAct-FX, das die Faktor X-kodierende Region von Position +1 bis +1116 umfaßt, in die HindIII/SmaI-Restriktionsschnittstellen von Plasmid pUC19 inseriert. Das resultierende Plasmid wurde mit pUC/FX bezeichnet. Zur Deletion des Aktivierungspeptids und Einbau von neuen Spaltstellen, z.B. Furin-, FXIa-, FXIIa, FXa-, FIIa-Spaltstellen, wurden das Bsp120I/BstXI FX-DNA-Fragment aus dem pUC/FX-Vektor durch synthetische Oligonucleotide ersetzt. Für den Einbau von einer Thrombin- oder FXIa-Spaltstelle wurde der BstXI-3'-Überhang mittels Mung Bean-Nuclease geglättet, so daß auch die Aminosäure Ile an Position 235 ausgetauscht werden konnte. Anschliessend wurden die deletierten Faktor X-DNA-Fragmente in Plasmid pAct-FX über HindIII-AgeI kloniert.

Zur Herstellung der Asp-Phe-Thr-Arg/Val FXIa-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0009 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG GAC TTC ACC AGG GTG-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und das Oligonucleotid antisens #0010 (5'-CAC CCT GGT GAA GTC CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 4) benutzt und in die Bsp120I- und die mit Mung Bean-Nuclease behandelte BstXI-Stelle eingesetzt. Dadurch

- 34 -

wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 und 235 in Asp-Phe-Thr und Val mutiert (Fig. 2 A).

Zur Herstellung der Arg/Thr FIIa-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0011 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA CGG ACC-3') (SEQ. ID. Nr. 5) und das Oligonucleotid antisens #0012 (5'-GGT CCG TTC CAG GGT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 6) benutzt und in die Bsp120I- und die mit Mung Bean-Nuclease behandelte BstXI-Stelle eingesetzt. Dadurch wurde die Aminosäure Ile an Position 235 in Thr mutiert (Fig. 2 B).

Zur Herstellung der Ile-Lys-Pro-Arg/Ile FXIIa-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0013 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC AAG CCC AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 7) und das Oligonucleotid antisens #0014 (5'-CT GGG CTT GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 8) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Ile-Lys-Pro mutiert (Fig. 2 C).

Zur Herstellung der Ser-Met-Thr-Arg/Ile Kallikrein-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0015 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGC ATG ACC AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 9) und das Oligonucleotid #0016 (5'-CT GGT CAT GCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 10) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Ser-Met-Thr mutiert (Fig. 2 D).

Zur Herstellung einer Met-Lys-Thr-Arg/Ile FXa-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0033 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATG AAA ACG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 11) und das Oligonucleotid antisens #0034 (5'-CT CGT TTT CAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 12) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren in Position 176 bis 178 von Thr-Leu-Glu in Met-Lys-Thr mutiert (Fig. 2 E).

Zur Herstellung einer Ile-Glu-Gly-Arg/Ile FXa-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0035 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC GAG GGA AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 13) und das Oligonucleotid antisens #0036 (5'-CT TCC CTC GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3')

(SEQ. ID. Nr. 14) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren in Position 176 bis 178 von Thr-Leu-Glu in Ile-Glu-Gly mutiert (Fig. 2 F).

Zur Herstellung einer Arg-Arg-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0017 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGG AAG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 15) und das Oligonucleotid antisens #0018 (5'-CT CTT CCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 16) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Arg-Arg-Lys mutiert (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Val-Arg-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0019 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG GTG AGG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 17) und das Oligonucleotid antisens #0020 (5'-CT CCT CAC CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 18) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Arg-Val-Arg mutiert (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Arg-Arg-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0021 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGG AGG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 19) und das Oligonucleotid antisens #0022 (5'-CT CCT CCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 20) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Arg-Arg-Arg mutiert (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Pro-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0023 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG CCC AAG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 21) und das Oligonucleotid antisens #0024 (5'-CT CTT GGG CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 22) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Arg-Pro-Lys mutiert (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Ile Arg-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0025 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC AGG AAG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 23) und das Oligo-

- 36 -

nucleotid antisens #0026 (5'-CT CTT CCT GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 24) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Ile-Arg-Lys mutiert (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Ser-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0027 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGC AAG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 25) und das Oligonucleotid antisens #0028 (5'-CT CTT GCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 26) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Arg-Ser-Lys mutiert (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Val-Thr-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0029 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG GTC ACG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 27) und das Oligonucleotid antisens #0030 (5'-CT CGT GAC CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 28) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 bis 178 in Arg-Val-Thr mutiert (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Leu-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0031 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG CTG AAA AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 29) und das Oligonucleotid antisense #0032 (5'-CT TTT CAG CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 30) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 und 178 in Arg und Lys mutiert (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Pro-Gln-Gly-Arg/Ile FXa-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0037 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG CCC CAA GGA AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 31) und das Oligonucleotid antisens #0038 (5'-CT TCC TTG GGG CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 32) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren in Position 176 bis 178 von Thr-Leu-Glu in Pro-Gln-Gly mutiert (Fig. 2 H).

Zur Herstellung der Thr-Ser-Thr-Arg/Ile FXIIa-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid sens #0039 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG

- 37 -

ACG AGC ACG AGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 33) und das Oligonucleotid antisens #0040 (5'-CT CGT GCT CGT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 34) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt. Dadurch wurden die Aminosäuren von Position 176 und 178 in Ser-Thr mutiert (Fig. 2 I).

Zur Herstellung einer Arg/Ile Trypsin-Spaltstelle wurde das Oligonucleotid #0041 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA CGG ATC-3') (SEQ. ID. Nr. 35) und das Oligonucleotid antisens #0042 (5'-CG TTC CAG GGT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ. ID. Nr. 36) benutzt und in die Bsp120I- und BstXI-Stellen eingesetzt (Fig. 2 J).

Die resultierenden Expressionsplasmide (siehe Fig. 3) umfassen den humanen beta-Actin-Promoter, 78bp des 5'UTR, das beta-Actin-Intron, die modifizierte Faktor X-Sequenz sowie 39bp der 3'UTR und die SV40-Polyadenylierungsstelle.

6.2. Konstruktion von Expressionsplasmiden für die Herstellung von FX β -Analogon.

Diese Konstrukte wurden von den oben beschriebenen Faktor X Δ -Analogon-Konstrukten abgeleitet, indem ein TGA-Stopcodon an Position 470 eingebaut wurde. Dazu wurden die Aminosäuren von Position 457 bis zum Stopcodon durch SpeI und partiellen BstEII-Verdau entfernt und mit dem Oligonucleotidpaar #0003 (5'-GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG TGA A-3') (SEQ. ID. Nr. 37) und #0004 (5'-CTA GTT CAC CTG GTT TTC ATG GAC CTG TCG ATC CAC TTG AGG AAG GCG-3') (SEQ. ID. Nr. 38) ersetzt. Eine schematische Darstellung der Faktor X $\Delta\beta$ -Analogon-Konstrukte ist in Fig. 7 gezeigt. Zur Vereinfachung der Abbildung wurden alle Faktor X $\Delta\beta$ -Analoge als ein allgemeines Konstrukt dargestellt, in dem die variable Aminosäuren in der Spaltstellenregion als schattiertes "X" angegeben sind.

6.3. Konstruktion von Expressionsplasmiden für die Herstellung von FX $\Delta\alpha$ -Analogon

Mit der Aktivierung des Faktor X durch die Abspaltung des 4,5

- 38 -

kDa-Aktivierungspeptids am N-terminalen Ende der schweren Kette entsteht die Faktor X α -Form. Diese Form wird anschließend durch auto-proteolytische Aktivität und Abspaltung des C-Terminus der schweren Kette zwischen Arg 469 und Gly 470 in die FX α β -Form umgesetzt. Zur Herstellung von Faktor X-Expressionsplasmiden, die zur Produktion von Faktor X Δ -Analogen führen, die nach Aktivierung ausschließlich als FX α -Form mit intaktem β -Peptid vorliegen, wurde die Aminosäure Arg469 in Lys mutiert, sodaß keine Prozessierung im C-terminalen Bereich der schweren Kette mehr stattfinden kann.

Dazu wurde die für die C-terminale Aminosäuresequenz codierende DNA-Sequenz des Faktor X von Position 1363 bis zum Stoppsignal durch partiellen BstEII-SpeI- Verdau entfernt und durch zwei zusammenligierte Oligonucleotidpaare ersetzt. Oligonucleotide #0005 (5'-GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AAG GGC TTG CCC AAG-3') (SEQ. ID. Nr. 39) und Oligonucleotid #0006 (5'-TTG GCC TTG GGC AAG CCC TTG GTT TTC ATG GAC CTG TCG ATC CAC TTG AGG AAG GCG-3') (SEQ. ID. Nr. 40) wurden mit Oligonucleotid #0007 (5'-GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG GTC ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA GAT CCC A-3') (SEQ. ID. Nr. 41) und Oligonucleotid #0008 (5'-CTA GTG GGA TCT CAC TTT AAT GGA GAG GAC GTT ATG ACC TCC GGG GCA TGG CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 42) ligiert. Die Mutation der Aminosäure Arg469 wird durch das Oligonucleotidpaar #0005-#0006 eingeführt. Eine schematische Darstellung der FX Δ -Analoge ist in Figur 7 gezeigt.

B e i s p i e l 7:

Bestimmung der N-Termini von Faktor X und Prozessierungsprodukten mit und ohne rFurin

Rekombinanter Faktor X wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, in CHO-Zellen mit endogenem Furin bzw., wie in Beispiel 5 beschrieben, in Furin-defizienten Zellen exprimiert. rFaktor X wurde sowohl aus a) nicht vorbehandeltem, b) 12 Stunden bei 37°C inkubiertem und c) 12 Stunden bei 37°C mit CHO-rFurin-Überstand vorbehandeltem Zellkulturüberstand hochexprimierender CHO-rFX-Klone, als auch aus d) nicht vorbehandeltem und e) 12 Stunden bei 37°C mit CHO-rFurin-Überstand vorbehandeltem Zellkultur-

Überstand von CHO-FD11-rFX-Klone isoliert. Die endständigen N-terminalen Aminosäuren von Faktor X und Prozessierungsprodukten der einzelnen Reaktionsansätze a) bis e) wurden über Edman-Analyse bestimmt. Figur 8 zeigt eine schematische Darstellung der Ergebnisse.

Der rFaktor X aus hochexprimierenden CHO-Zellen tritt in Form der reifen schweren und leichten Ketten, sowie einzelkettig, zum Teil noch Propeptid-haltig auf. Nach einer Inkubation dieser Zellkulturüberstände für 12 Stunden bei 37°C (b) treten zusätzlich, wie schon von Wolf et al. (1991, J. Bio. Chem. 266:13726-13730) beschrieben, fehlerhafte N-Termini der rFX-leichten Kette mit 3 zusätzlichen Aminosäuren Val38-Thr39-Arg40 auf. Diese kryptischen Enden werden auch bei der Sequenzierung von rFX-Material aus nicht vorbehandelten CHO-FD11-Zellen (d) gefunden. Diese Beobachtung zeigt, daß das Auftreten von diesen fehlerhaften N-Termini vermieden werden kann, indem angemessene Bedingungen bzw. Zellkulturbedingungen, Lagerung und Reinigungsverfahren zur Minimierung der rFX-Proteolyse durch CHO-Proteasen, benützt werden.

Im Gegensatz zu dem gereinigten Material aus CHO-Zellen (a und b) ist der rFX aus nicht amplifizierten, Furin-defizienten Zellen (d) nur in Form unprozessierter einzelkettiger Vorläufer vorhanden. Es werden auch keine N-terminalen Sequenzen gefunden, die dem Propeptid-Anteil entsprechen. Damit wurde gezeigt, daß die Prozessierung von einzelkettigem rFX-Vorläufer in leichte/schwere Kette in Furin-defizienten CHO-Zellen (d) nicht mehr stattfindet, was auf eine zentrale Rolle der Endoprotease Furin in diesem Prozessierungsschritt in vivo schliessen läßt. Zusätzlich wurde gezeigt, daß die Prozessierung Propeptid-haltiger rFX-Moleküle auch in Furin-defizienten CHO-Zellen stattfindet und daher Furin in vivo keine essentielle Rolle in diesem Prozessierungsschritt spielt. Durch die Inkubation von rFX aus CHO-Zellen (c) und CHO-FD11-Zellen (e) in Gegenwart von Furin werden ausschließlich leichte und schwere Ketten mit korrekten N-Termini gefunden. Damit wurde nachgewiesen, daß sowohl die einzelkettigen FX-Vorläufer als auch die Propeptid-haltigen rFX-Moleküle, durch in vitro-Prozessierung in homogenen, reifen Faktor X

umgesetzt werden. Damit weist der in Gegenwart von Furin prozessierte Faktor X eine aussergewöhnliche strukturelle Integrität auf.

B e i s p i e l 8:

Expression und Charakterisierung der rekombinanten FX- Deletionsmutante mit der Spaltstelle Arg-Val-Thr-Arg/Ile (FX Δ ^{RVTR/I})

Das Expressionsplasmid, das für die FX-Deletionsmutante mit der Spaltstelle Arg-Val-Thr-Arg/Ile (FX Δ ^{RVTR/I}) kodiert, wurde, wie schon in Beispiel 1 beschrieben, mit dem Selektionsmarker pSV/dhfr in dhfr-defiziente CHO-Zellen co-transfiziert. Das rekombinante Protein FX Δ ^{RVTR/I} aus permanenten CHO-Klonen wurde mittels Western Blot-Analyse charakterisiert. Wie in Figur 9, Spur 4 sichtbar ist, tritt das rekombinante Protein in der Form einer Doppelbande von ca. 56 und 50kD auf. Im Zellkulturüberstand nicht transfizierter CHO-Zellen ist kein FX-reaktives Material detektierbar (Spur 2). Diese Ergebnisse schließen aus, daß diese Proteinbanden aufgrund einer Verunreinigung der analysierten Überstände von Wildtyp FX aus Resten an bovinem Serum im Zellkulturmedium auftreten. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die Doppelbande auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen, z.B. die Anwesenheit des Propeptids oder unterschiedliche Glycosylierung des rFX Δ ^{RVTR/I}-Moleküls, zurückzuführen ist.

Die in diesem Konstrukt eingefügte Spaltstelle Arg-Val-Thr-Arg/Ile ist identisch mit der Propeptid-Spaltstelle des Wildtyp FX-Moleküls, die durch eine CHO-Endoprotease in vivo effizient erkannt und gespalten wird (siehe Beispiel 7). Die Western Blot-Analyse zeigt keine zusätzlichen 35kD- bzw. 31kD-schweren FX-Moleküle, die den aktivierten α - und β -Formen der rFX Δ ^{RVTR/I}-schweren Ketten entsprechen würden. Diese Ergebnisse zeigen, daß entweder die Menge an Endoprotease für die Aktivierung des Proteins nicht ausreichend ist oder/und, daß die Spaltstelle Arg-Val-Thr-Arg/Ile in der vorliegenden Sequenzumgebung in vivo nicht oder nur ineffizient erkannt und gespalten wird. rFX Δ ^{RVTR/I} liegt demnach praktisch ausschließlich einkettig vor.

B e i s p i e l 9:

Aktivierung des rekombinanten rFX Δ ^{RVTR/I}-Proteins mittels rekombinanter Furin-Derivate in vitro.

Obwohl die Spaltstelle Arg-Val-Thr-Arg im rFX-Propeptid in vivo von einer anderen Protease als Furin erkannt wird, wurde im Beispiel 2 bewiesen, daß diese Sequenz sehr effizient und korrekt durch ein rFurin-Derivat in vitro gespalten wird.

Um die Aktivierbarkeit des rFX Δ ^{RVTR/I}-Proteins durch rFurin in vitro zu testen, wurden Mischexperimente durchgeführt. Hierfür wurde Zellkulturüberstand von CHO-FX Δ ^{RVTR/I}-Zellen mit gereinigtem rFurin-Derivat rFurin Δ Cys-Spacer-10xHis (siehe Patentanmeldung EP 0 775 750 A2) in Anwesenheit von 20mM Hepes, pH 7,0, 150 mM NaCl, 4mM CaCl₂ und 0,1% BSA in einem 1:1-Verhältnis versetzt. Im Kontrollexperiment wurden der CHO-rFX Δ ^{RVTR/I}-Überstand im gleichen Verhältnis nur mit dem BSA-haltigen Puffer gemischt. Die Zugabe von BSA soll die enzymatische Aktivität des rFurin-Derivates sowie die in Folge entstehenden aktivierten rFX Δ ^{RVTR/I}-Produkte stabilisieren. Aliquots der Reaktionsansätze vor und nach einer Inkubationszeit von 6, 24, 48 und 72 Stunden (t=0, t=6, t=24, t=48, t=72) bei 37°C wurden auf rFX Δ ^{RVTR/I}-Prozessierung mittels Western Blot-Analyse getestet (Figur 10). Im Mischexperiment ohne rFurin-Zugabe (Fig. 10B) ist keine Veränderung des Bandenmusters im Laufe der Inkubationszeit sichtbar (Spur 4 bis 9). Aufgrund der Präsenz des BSA in den Reaktionsansätzen sind nur die leichteren rFX Δ ^{RVTR/I}-Moleküle (50 kD) gut sichtbar, weil die 56kD-schweren Moleküle von der BSA-Bande überdeckt werden.

In Anwesenheit des rFurin-Derivates (Fig. 10 A) tritt schon nach 6 Stunden Inkubation (Spur 5) eine 35kD große Proteinbande auf, die der α -Form der FX-schweren Kette entspricht (Vergleich mit Spur 9) auf. Dieses Protein akkumuliert im Laufe der Inkubation und wird anschließend auch, wie bei Plasma FX bekannt, in die proteolytische β -Form umgesetzt, welche durch proteolytische Umwandlung aus der α -Form entsteht (Spur 7 und 8). Parallel zur Detektion der aktivierten Formen der schweren Ketten werden leichte Ketten von 22kD und 20kD sichtbar, die in Beispiel 1.b.

- 42 -

als Propeptid-freie, carboxylierte LC2 (die der eigentlich funktionellen Form entspricht) bzw. als Propeptid-freie, untercarboxylierte LC4-Form der leichten Kette identifiziert wurden. Die Anwesenheit der untercarboxylierten LC4-Form bestätigt, daß in den analysierten CHO-Klonen die posttranslationalen Modifikationsmechanismen limitiert sind. Obwohl die 50kD-Bande unverändert erscheint, während scheinbar die 56kD-Form direkt zu leichten/schweren Ketten abgebaut wird, so wird tatsächlich das 56kD-Molekül zunächst zur 50kD-Form umgewandelt und erst anschließend in eine leichte und eine schwere Kette gespalten. Dies ist auf die Anwesenheit des Propeptids im 56kD-Molekül zurückzuführen, welches zunächst unter Bildung der 50kD-Form entfernt wird.

Damit wurde gezeigt, daß das $rFX\Delta^{RVTR/I}$ -Konstrukt über die eingebaute Arg-Val-Thr-Arg/Ile-Spaltstelle durch rFurin-Derivate in vitro aktivierbar ist, und die entstehenden Prozessierungsprodukte des $rFX\Delta^{RVTR/I}$ -Konstrukts in der Größe jenen von Plasma FXa entsprechen. Das Auftreten von $FX\Delta\beta$, die durch autoproteolytische Prozessierung von $FX\Delta\alpha$ entsteht, zeigt die Funktionalität des $rFX\Delta^{RVTR/I}$ -Moleküls.

- 43 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: IMMUNO AG
(B) STRASSE: Industriestrasse 67
(C) ORT: Wien
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1220

(A) NAME: Friedrich Dorner
(B) STRASSE: Peterlinigasse 17
(C) ORT: Wien
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1238

(A) NAME: Falko-Guenther Falkner
(B) STRASSE: Mannsdorf 116
(C) ORT: Mannsdorf
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 2304

(A) NAME: Michele Himmelspach
(B) STRASSE: Breitstetten 19
(C) ORT: Leopoldsdorf
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 2285

(A) NAME: Michael Pfeleiderer
(B) STRASSE: Johann Nestroygasse 12/16
(C) ORT: Gross-Enzersdorf
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 2301

(A) NAME: Uwe Schlokot
(B) STRASSE: Hauptstrasse 51
(C) ORT: Orth/Donau
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 2304

(A) NAME: Johann Eibl
(B) STRASSE: Gustav Tschermakgasse 2
(C) ORT: Wien
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1180

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Faktor X-Deltionsmutanten und Analoge
davon

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 44

- 44 -

(1v) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATTACTCGAG AAGCTTACCA TGGGGCGCCC ACTG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATTACAATTG CTGCAGGGAT CCAC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGGACTTCA CCAGGGTG

38

- 45 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CACCTGGTG AAGTCCTGTT TCCACAGGG GTAG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACCCTGG AACGGACC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGTCCGTTCC AGGGTCTGTT TCCACAGGG GTAG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- 46 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGATCAAGC CCAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CTGGGCTTGA TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGCATGA CCAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CTGGTCATGC TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

- 47 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGATGAAAA CGAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CTCGTTTTCA TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGATCGAGG GAAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- 48 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CTTCCCTCGA TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGAGGA AGAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CTCTTCCTCC TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGGTGA GGAGGATC

38

- 49 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

CTCCTCACCC TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGAGGA GGAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

CTCCTCCTCC TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- 50 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGCCCA AGAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

CTCTTGGGCC TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGATCAGGA AGAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

CTCTTCCTGA TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

- 51 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGAGCA AGAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

CTCTTGCTCC TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGGTCA CGAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- 52 -

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

CTCGTGACCC TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGCTGA AAAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

CTTTTCAGCC TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGCCCCAAG GAAGGATC

38

- 53 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

CTTCCTTGGG GCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACGAGCA CGAGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

CTCGTGCTCG TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- 54 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACCCTGG AACGGATC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

CGTTCCAGGG TCTGTTTCCC ACAGGGGTAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

GTCACCGCCT TCCTCAAGTG GATCGACAGG TCCATGAAAA CCAGGTGAA

49

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

CTAGTTCACC TGGTTTTTCAT GGACCTGTCG ATCCACTTGA GGAAGGCG

48

- 55 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

- (1) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

GTCACCGCCT TCCTCAAGTG GATCGACAGG TCCATGAAAA CCAAGGGCTT GCCCAAG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

TTGGCCTTGG GCAAGCCCTT GGTTTTCATG GACCTGTGCA TCCACTTGAG GAAGGCG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

GCCAAGAGCC ATGCCCCGGA GGTGATAACG TCCTCTCCAT TAAAGTGAGA TCCCA

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

- (1) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- 56 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

CTAGTGGGAT CTCACCTTAA TGGAGAGGAC GTTATGACCT CCGGGGCATG GCTC

54

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1467 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..1467

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

| | |
|---|-----|
| ATG GGG CGC CCA CTG CAC CTC GTC CTG CTC AGT GCC TCC CTG GCT GGC | 48 |
| Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly | |
| 1 5 10 15 | |
| CTC CTG CTG CTC GGG GAA AGT CTG TTC ATC CGC AGG GAG CAG GCC AAC | 96 |
| Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn | |
| 20 25 30 | |
| AAC ATC CTG GCG AGG GTC ACG AGG GCC AAT TCC TTT CTT GAA GAG ATG | 144 |
| Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met | |
| 35 40 45 | |
| AAG AAA GGA CAC CTC GAA AGA GAG TGC ATG GAA GAG ACC TGC TCA TAC | 192 |
| Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr | |
| 50 55 60 | |
| GAA GAG GCC CGC GAG GTC TTT GAG GAC AGC GAC AAG ACG AAT GAA TTC | 240 |
| Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe | |
| 65 70 75 80 | |
| TGG AAT AAA TAC AAA GAT GGC GAC CAG TGT GAG ACC AGT CCT TGC CAG | 288 |
| Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln | |
| 85 90 95 | |
| AAC CAG GGC AAA TGT AAA GAC GGC CTC GGG GAA TAC ACC TGC ACC TGT | 336 |
| Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys | |
| 100 105 110 | |
| TTA GAA GGA TTC GAA GGC AAA AAC TGT GAA TTA TTC ACA CGG AAG CTC | 384 |
| Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu | |
| 115 120 125 | |
| TGC AGC CTG GAC AAC GGG GAC TGT GAC CAG TTC TGC CAC GAG GAA CAG | 432 |
| Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln | |
| 130 135 140 | |

- 57 -

| | |
|---|------|
| AAC TCT GTG GTG TGC TCC TGC GCC CGC GGG TAC ACC CTG GCT GAC AAC Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn 145 150 155 160 | 480 |
| GGC AAG GCC TGC ATT CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr 165 170 175 | 528 |
| CTG GAA CGC AGG AAG AGG TCA GTG GCC CAG GCC ACC AGC AGC AGC GGG Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly 180 185 190 | 576 |
| GAG GCC CCT GAC AGC ATC ACA TGG AAG CCA TAT GAT GCA GCC GAC CTG Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu 195 200 205 | 624 |
| GAC CCC ACC GAG AAC CCC TTC GAC CTG CTT GAC TTC AAC CAG ACG CAG Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln 210 215 220 | 672 |
| CCT GAG AGG GGC GAC AAC AAC CTC ACC AGG ATC GTG GGA GGC CAG GAA Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu 225 230 235 240 | 720 |
| TGC AAG GAC GGG GAG TGT CCC TGG CAG GCC CTG CTC ATC AAT GAG GAA Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu 245 250 255 | 768 |
| AAC GAG GGT TTC TGT GGT GGA ACT ATT CTG AGC GAG TTC TAC ATC CTA Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu 260 265 270 | 816 |
| ACG GCA GCC CAC TGT CTC TAC CAA GCC AAG AGA TTC AAG GTG AGG GTA Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val 275 280 285 | 864 |
| GGG GAC CGG AAC ACG GAG CAG GAG GAG GGC GGT GAG GCG GTG CAC GAG Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu 290 295 300 | 912 |
| GTG GAG GTG GTC ATC AAG CAC AAC CGG TTC ACA AAG GAG ACC TAT GAC Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp 305 310 315 320 | 960 |
| TTC GAC ATC GCC GTG CTC CGG CTC AAG ACC CCC ATC ACC TTC CGC ATG Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met 325 330 335 | 1008 |
| AAC GTG GCG CCT GCC TGC CTC CCC GAG CGT GAC TGG GCC GAG TCC ACG Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr 340 345 350 | 1056 |
| CTG ATG ACG CAG AAG ACG GGG ATT GTG AGC GGC TTC GGG CGC ACC CAC Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His 355 360 365 | 1104 |
| GAG AAG GGC CGG CAG TCC ACC AGG CTC AAG ATG CTG GAG GTG CCC TAC Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr 370 375 380 | 1152 |

- 58 -

[illegible]

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 489 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Arg | Pro | Leu | His | Leu | Val | Leu | Leu | Ser | Ala | Ser | Leu | Ala | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| Leu | Leu | Leu | Leu | Gly | Glu | Ser | Leu | Phe | Ile | Arg | Arg | Glu | Gln | Ala | Asn |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Asn | Ile | Leu | Ala | Arg | Val | Thr | Arg | Ala | Asn | Ser | Phe | Leu | Glu | Glu | Met |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Lys | Lys | Gly | His | Leu | Glu | Arg | Glu | Cys | Met | Glu | Glu | Thr | Cys | Ser | Tyr |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Glu | Glu | Ala | Arg | Glu | Val | Phe | Glu | Asp | Ser | Asp | Lys | Thr | Asn | Glu | Phe |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Trp | Asn | Lys | Tyr | Lys | Asp | Gly | Asp | Gln | Cys | Glu | Thr | Ser | Pro | Cys | Gln |
| | | | | 85 | | | | 90 | | | | | | 95 | |

- 59 -

Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys
 100 105 110

Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu
 115 120 125

Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln
 130 135 140

Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn
 145 150 155 160

Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr
 165 170 175

Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly
 180 185 190

Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu
 195 200 205

Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln
 210 215 220

Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 225 230 235 240

Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu
 245 250 255

Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu
 260 265 270

Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val
 275 280 285

Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu
 290 295 300

Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp
 305 310 315 320

Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met
 325 330 335

Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr
 340 345 350

Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His
 355 360 365

Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr
 370 375 380

Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln
 385 390 395 400

Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln
 405 410 415

- 60 -

Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe
420 425 430

Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Ser Cys Ala Arg Lys Gly Lys
435 440 445

Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg
450 455 460

Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu
465 470 475 480

Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys *
485

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Faktor X Δ -Analogon, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Deletion der Aminosäuren Arg180 bis Arg234 der Faktor X Δ -Aminosäuresequenz und eine Modifikation im Bereich der Aminosäuresequenz zwischen Gly173 und Arg179 aufweist.
2. Faktor X Δ -Analogon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Prozessierungsstelle einer nicht-natürlicherweise an dieser Stelle der Faktor X Sequenz spaltenden Protease darstellt.
3. Faktor X Δ -Analogon nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation mindestens ein Aminosäureaustausch im Bereich der Aminosäuresequenz zwischen Gly173 und Arg179 bezogen auf die Aminosäurenumerierung gemäß Fig. 1, ist.
4. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Faktor X-Sequenz mit Gly173-R6-R5-R4-R3-R2-Arg179/R1(235) enthält, wobei
 - a) R1 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Val, Ser, Thr, Ile oder Ala
 - b) R2 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Glu, Thr, Pro, Gly, Lys oder Arg
 - c) R3 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Leu, Phe, Lys, Met, Gln, Glu, Ser, Val, Arg oder Pro
 - d) R4 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Thr, Asp, Asn, Ile, Ser, Met, Pro, Arg oder Lys
 - e) R5 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asn, Lys, Ser, Glu, Gln, Ala, His oder Arg und
 - f) R6 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asp, Phe, Thr, Arg, Leu oder Ser ist.
5. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Prozessierungsstelle für eine Protease ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa,

Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, darstellt.

6. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es als einzelkettiges Molekül in enzymatisch inaktiver Form vorliegt.

7. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Aktivierung des inaktiven, einzelkettigen Faktor X Δ -Analogon-Polypeptides in die zweikettige, aktive Faktor Xa-Analogon-Form erlaubt.

8. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es eine weitere Modifikation im Bereich der C-terminalen Faktor X-Aminosäuresequenz aufweist.

9. Faktor X Δ -Analogon nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation im C-terminalen Bereich der β -Peptidspaltstelle aufweist.

10. Faktor X Δ -Analogon nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Mutation, Deletion oder Insertion im Bereich der Faktor X-Aminosäuresequenz zwischen Aminosäureposition Arg469 und Ser476 ist.

11. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Abspaltung des β -Peptids verhindert.

12. Faktor X Δ -Analogon nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Deletion des Faktor X β -Peptids aufweist.

13. Faktor X Δ -Analogon nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Translationsstoppsignal im C-terminalen Bereich der Faktor X-Sequenz aufweist.

14. Faktor X Δ -Analogon nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Translationsstoppsignal an Position der Aminosäure Lys470 der Faktor X-Sequenz aufweist.

- 63 -

15. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation im Bereich der Aminosäuresequenz zwischen Gly173 und Arg179 eine Aktivierung des inaktiven Faktor X-Analogons zu aktivem Faktor X Δ -Analogon in vitro erlaubt.

16. Faktor X Δ -Analogon nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Aktivierung durch eine Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, erlaubt.

17. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es ein intaktes β -Peptid aufweist und als Faktor X $\Delta\alpha$ vorliegt.

18. Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Deletion des β -Peptids aufweist.

19. Rekombinante DNA, kodierend für ein Faktor X Δ -Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 18, enthalten in einem Vektor zur rekombinanten Expression des kodierten Proteins.

20. Transformierte Zellen enthaltend eine rekombinante DNA gemäß Anspruch 19.

21. Präparation enthaltend gereinigtes Faktor X Δ -Analogon, das eine Deletion der Aminosäuren Arg180 bis Arg234 der Faktor X-Aminosäuresequenz und eine Modifikation im Bereich der Aminosäuresequenz zwischen Gly173 und Arg179 aufweist.

22. Präparation nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein einzelkettiges Faktor X Δ -Analogon in enzymatisch inaktiver Form mit einer Reinheit von mindestens 80 %, vorzugsweise 90 %, besonders bevorzugt 95 %, enthält und keine inaktiven, proteolytischen Intermediate von Faktor X/Xa-Analogon aufweist.

23. Präparation nach einem der Ansprüche 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie Faktor X Δ -Analogon als Faktor X $\Delta\alpha$ enthält.
24. Präparation nach einem der Ansprüche 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie Faktor X Δ -Analogon als FX $\Delta\beta$ enthält.
25. Präparation nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß sie Faktor X Δ -Analogon als einzelkettiges Molekül in isolierter Form enthält.
26. Präparation nach einem der Ansprüche 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Faktor X Δ -Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität des Moleküls enthält.
27. Präparation nach einem der Ansprüche 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Faktor X Δ -Analogon enthält, das eine Modifikation aufweist, die eine Aktivierung von Faktor X Δ -Analogon zu Faktor Xa-Analogon in vitro erlaubt.
28. Präparation nach einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.
29. Präparation nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer geeigneten Vorrichtung, vorzugsweise einer Applikationsvorrichtung, in Kombination mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIa, Faktor XIIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, vorliegt.
30. Präparation nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponenten räumlich voneinander getrennt vorliegen.
31. Präparation enthaltend ein gereinigtes Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, das insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X Δ /Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Abbauprodukten, erhältlich durch Akti-

vierung eines Faktor X Δ -Analogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20.

32. Präparation nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein aktives Faktor Xa-Analogon als zweikettiges Molekül in isolierter Form enthält.

33. Präparation nach einem der Ansprüche 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß sie Faktor Xa-Analogon mit einer Reinheit von mindestens 80 %, vorzugsweise 90 %, besonders bevorzugt 95 %, enthält und keine inaktiven, proteolytischen Intermediate von Faktor X/Xa-Analogon aufweist.

34. Präparation nach einem der Ansprüche 31 bis 33 dadurch gekennzeichnet, daß sie einen physiologisch akzeptablen Träger enthält und in lagerstabiler Form vorliegt.

35. Präparation nach einem der Ansprüche 21 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegebenenfalls als weiteren Bestandteil einen Blutfaktor oder eine aktivierte Form eines Blutfaktors enthält.

36. Präparation nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß sie als weiteren Bestandteil mindestens eine Komponente mit Faktor VIII Bypass-Aktivität enthält.

37. Präparation nach einem der Ansprüche 21 oder 36, dadurch gekennzeichnet, daß sie als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert ist.

38. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 21 bis 37 zur Herstellung eines Arzneimittels.

39. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 21 bis 37 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, wie etwa Hämophilie-Patienten oder hämophile Patienten, welche Inhibitor-Antikörper entwickelt haben.

40. Verfahren zur Herstellung einer Präparation enthaltend gereinigtes rekombinantes Faktor X Δ -Analogon, dadurch gekennzeichnet, daß ein durch rekombinante Herstellung gewonnenes Faktor X Δ -Analogon als einzelkettiges Molekül isoliert und über ein chromatographisches Verfahren gereinigt wird.

41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Schritte umfaßt:

- Bereitstellen einer Nukleinsäure kodierend für ein Faktor X Δ -Analogon gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18
- Transfektion einer geeigneten Zelle
- Expression des Faktor X Δ -Analogons
- Isolieren von einzelkettigem Faktor X Δ -Analogon und
- Reinigung des Polypeptids.

42. Verfahren zur Herstellung einer Präparation enthaltend aktives Faktor Xa-Analogon, dadurch gekennzeichnet, daß eine gemäß einem der Ansprüche 40 oder 41 hergestellte Präparation einem Aktivierungsschritt unterzogen wird.

43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß die Präparation enthaltend einzelkettiges Faktor X Δ -Analogon mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, vorliegen, in Kontakt gebracht wird, unter Bedingungen, die es erlauben, daß es in die zweikettige Faktor Xa-Analogon-Form gespalten wird.

44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease immobilisiert ist.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 bis 44, dadurch gekennzeichnet, daß ein gereinigtes Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, das insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X Δ /Xa-Analogon-Intermediaten, gewonnen wird.

1/12

(-40)

1

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly Leu Leu Leu
 ATG GGG CGC CCA CTG CAC CTC GTC CTG CTC AGT GCC TCC CTG GCT GGC CTC CTG CTG
 9 18 27 36 45 54

(-4)

(-1)

40

Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg
 CTC GGG GAA AGT CTG TTC ATC CGC AGG GAG CAG GCC AAC AAC ATC CTG GCG AGG GTC ACG AGG
 66 75 84 93 102 111 120

(+1)

41

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr
 GCC AAT TCC TTT CTT GAA GAG ATG AAG AAA GGA CAC CTC GAA AGA GAG TGC ATG GAA GAG ACC
 129 138 147 156 165 174 183

Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn
 TGC TCA TAC GAA GAG GCC CGC GAG GTC TTT GAG GAC AGC GAC AAG ACG AAT GAA TTC TGG AAT
 192 201 210 219 228 237 246

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp
 AAA TAC AAA GAT GGC GAC CAG TGT GAG ACC AGT CCT TGC CAG AAC CAG GGC AAA TGT AAA GAC
 255 264 273 282 291 300 309

Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe
 GGC CTC GGG GAA TAC ACC TGC ACC TGT TTA GAA GGA TTC GAA GGC AAA AAC TGT GAA TTA TTC
 318 327 336 345 354 363 372

Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn
 ACA CGG AAG CTC TGC AGC CTG GAC AAC GGG GAC TGT GAC CAG TTC TGC CAC GAG GAA CAG AAC
 381 390 399 408 417 426 435

Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro
 TCT GTG GTG TGC TCC TGC GCC CGC GGG TAC ACC CTG GCT GAC AAC GGC AAG GCC ATT CCC
 444 453 462 471 480 489 498

R6 R5 R4 R3 R2

173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183

Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala
 ACA GGG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA CGC AGG AAG AGG TCA GTG GCC CAG GCC
 507 516 525 534 543 552 561

Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu
 ACC AGC AGC AGC GGG GAG GCC CCT GAC AGC ATC ACA TGG AAG CCA TAT GAT GCA GCC GAC CTG
 570 579 588 597 606 615 624

Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp
 GAC CCC ACC GAG AAC CCC TTC GAC CTG CTT GAC TTC AAC CAG ACG CAG CCT GAG AGG GGC GAC
 633 642 651 660 669 678 687

R1

234 235

Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
 AAC AAC CTC ACC AGG ATC GTG GGA GGC CAG GAA TGC AAG GAC GGG GAG TGT CCC TGG CAG GCC
 696 705 714 723 732 741 750

Fig. 1-1

2/12

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile
 CTG CTC ATC AAT GAG GAA AAC GAG GGT TTC TGT GGT GGA ACT ATT CTG AGC GAG TTC TAC ATC
 759 768 777 786 795 804 813

Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn
 CTA ACG GCA GCC CAC TGT CTC TAC CAA GCC AAG AGA TTC AAG GTG AGG GTA GGG GAC CGG AAC
 822 831 840 849 858 867 876

Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg
 ACG GAG CAG GAG GAG GGC GGT GAG GCG GTG CAC GAG GTG GAG GTG GTC ATC AAG CAC AAC CGG
 885 894 903 912 921 930 939

Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala al Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe
 TTC ACA AAG GAG ACC TAT GAC TTC GAC ATC GCC GTG CTC CGG CTC AAG ACC CCC ATC ACC TTC
 948 957 966 975 984 993 1002

Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr
 CGC ATG AAC GTG GCG CCT GCC CTC CCC GAG CGT GAC TGG GCC GAG TCC ACG CTG ATG ACG
 1011 1020 1029 1038 1047 1056 1065

Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg
 CAG AAG ACG GGG ATT GTG AGC GGC TTC GGG CGC ACC CAC GAG AAG GGC CGG CAG TCC ACC AGG
 1074 1083 1092 1101 1110 1119 1128

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile
 CTC AAG ATG CTG GAG GTG CCC TAC GTG GAC CGC AAC AGC TGC AAG CTG TCC AGC AGC TTC ATC
 1137 1146 1155 1164 1173 1182 1191

Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp
 ATC ACC CAG AAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC GAC ACC AAG CAG GAG GAT GCC TGC CAG GGG GAC
 1200 1209 1218 1227 1236 1245 1254

Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp
 AGC GGG GGC CCG CAC GTC ACC CGC TTC AAG GAC ACC TAC TTC GTG ACA GGC ATC GTC AGC TGG
 1263 1272 1281 1290 1299 1308 1317

Gly Glu Ser Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys
 GGA GAG AGC TGT GCC CGT AAG GGG AAG TAC GGG ATC TAC ACC AAG GTC ACC GCC TTC CTC AAG
 1326 1335 1344 1353 1362 1371 1380

Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val
 TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG GGC TTG CCC AAG GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG GTC
 1389 1398 1407 1416 1425 1434 1443

488
 Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys TER
 ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA
 1452 1461 1467

Prä-/Propeptid
 'Connecting' Tripeptid
 Aktivierungs-Peptid

Fig. 1-2

Oligonucleotide
verwendet zur
Klonierung

0009/0010

0011/0012

0013/0014

0015/0016

0033/0034

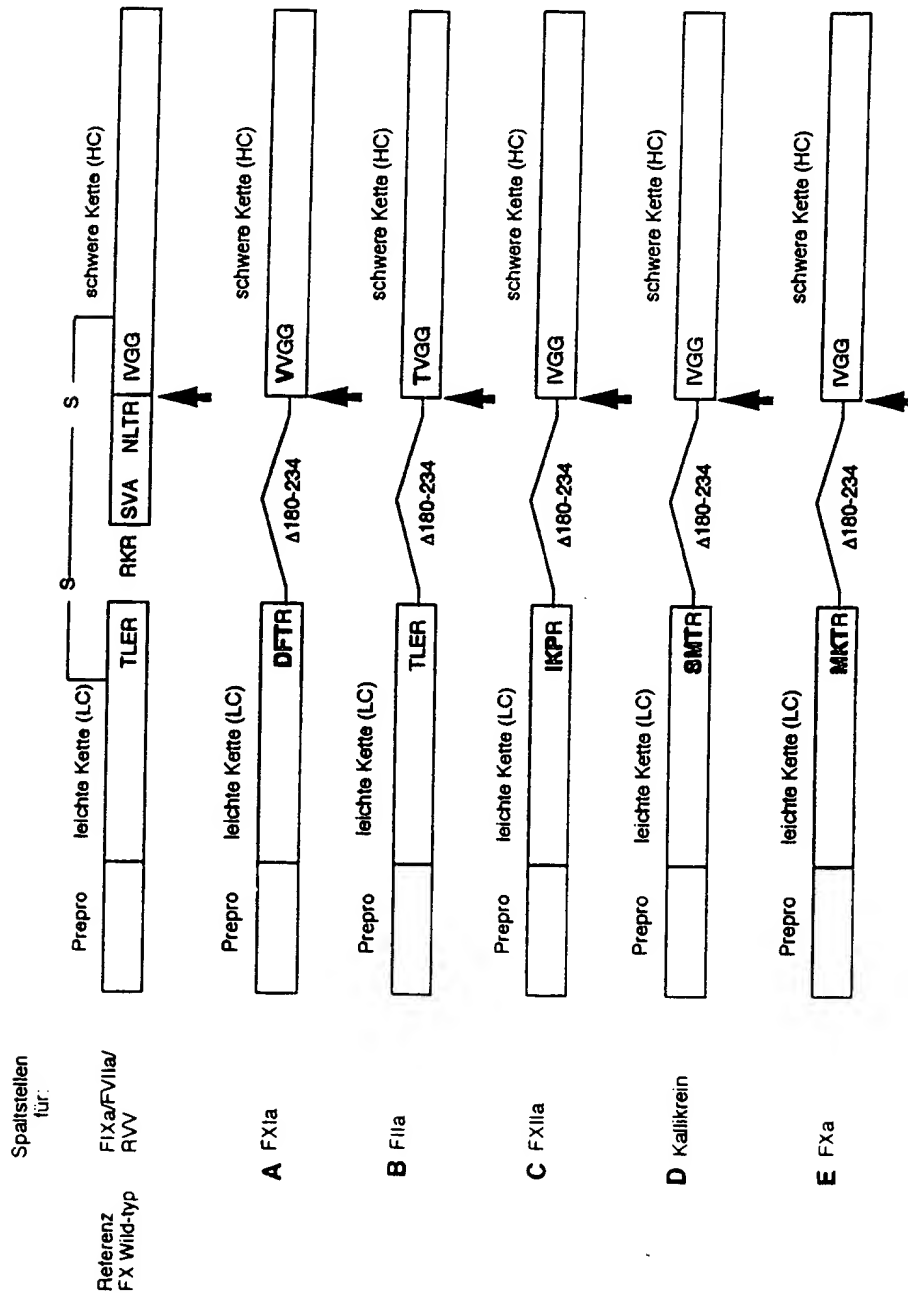


Fig. 2.1.

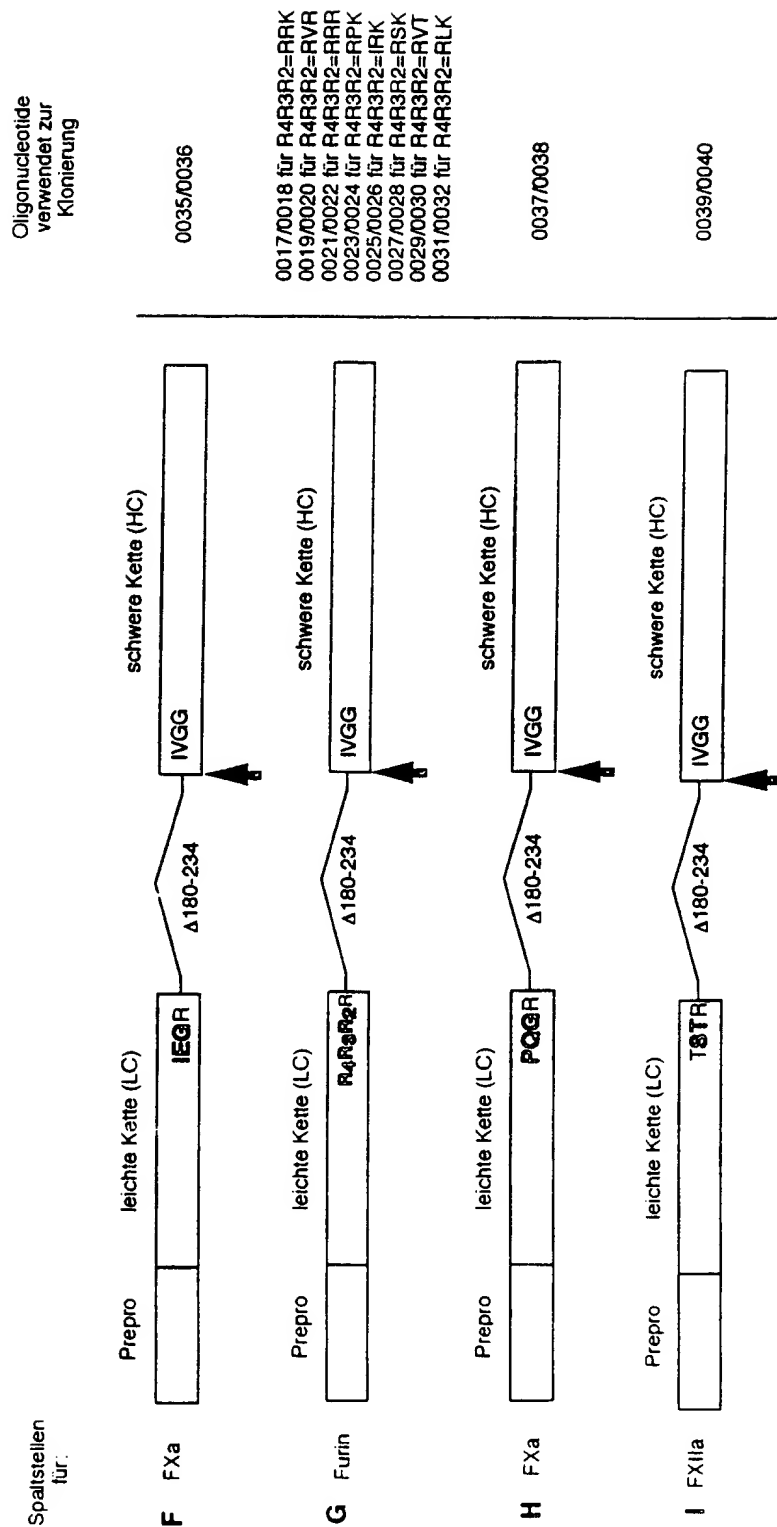


Fig. 2.2

5/12

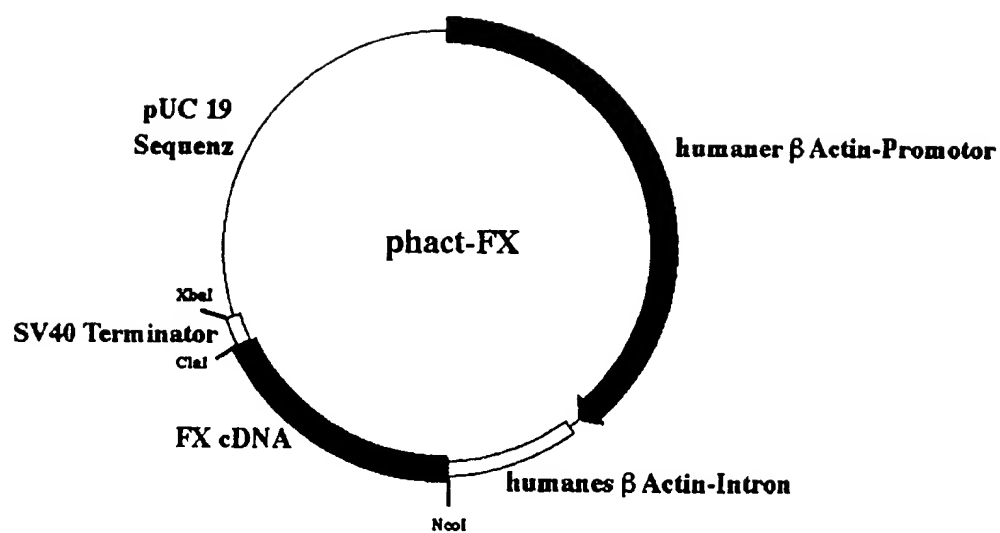


Fig. 3

6/12

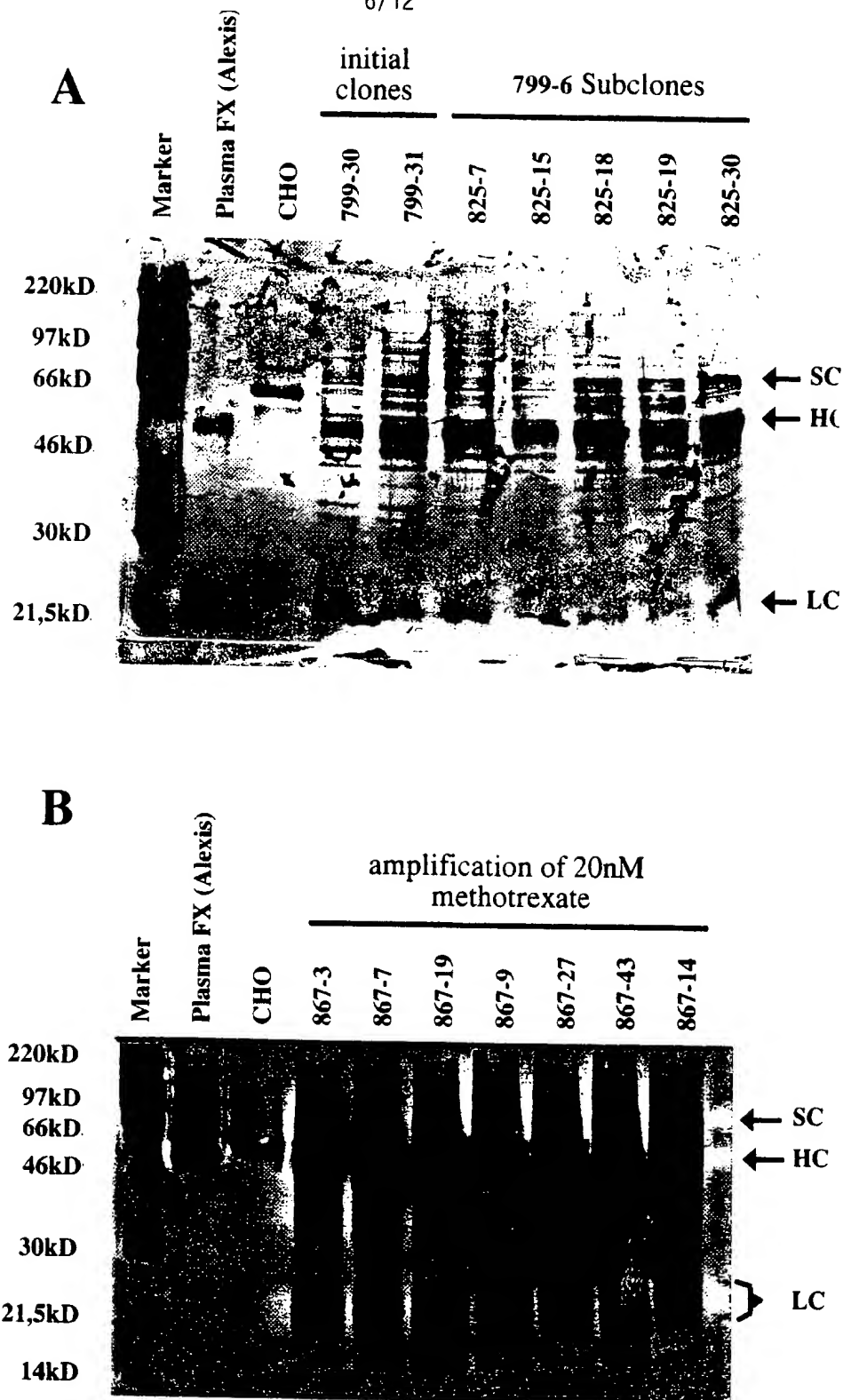
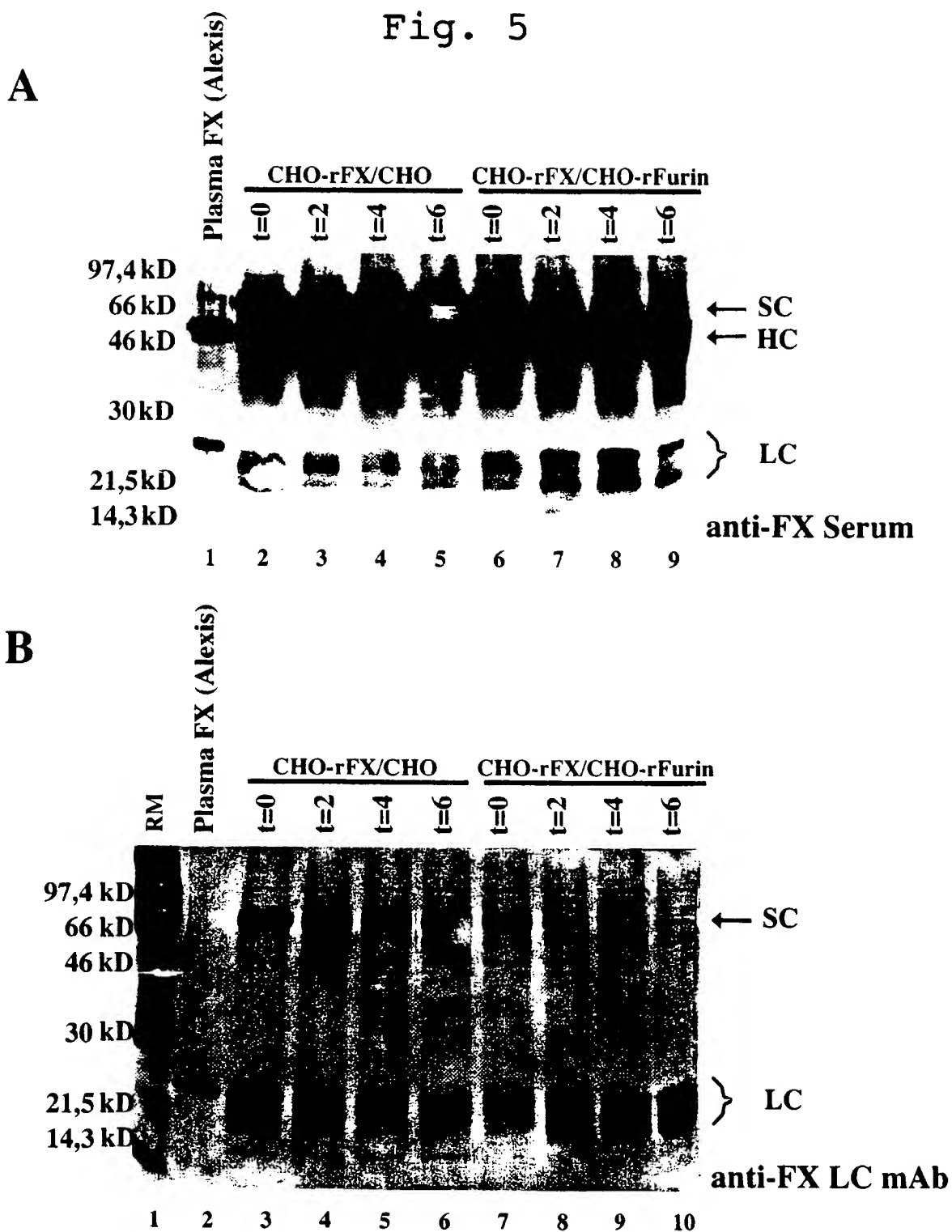


Fig. 4

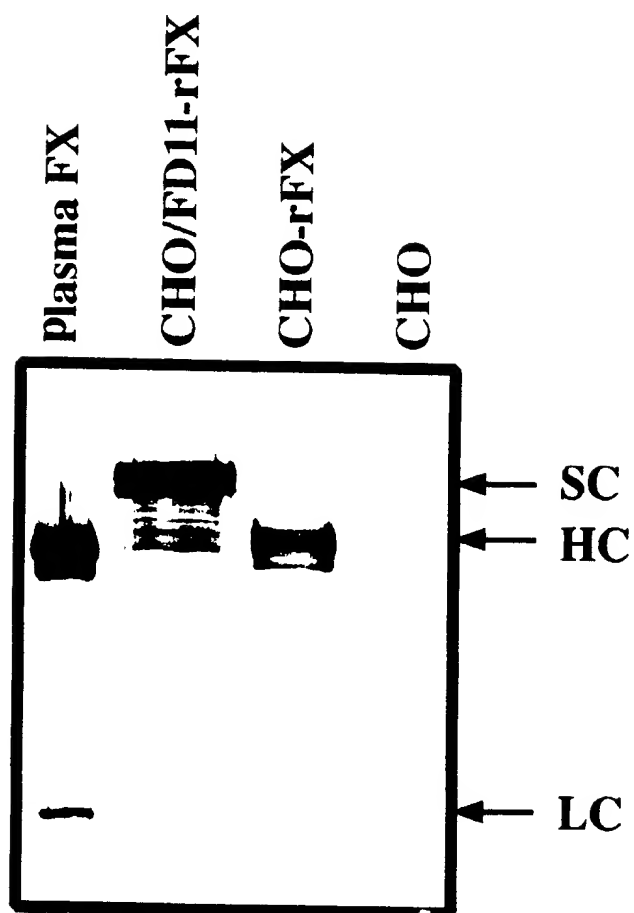
ERSATZBLATT (REGEL 26)

Fig. 5



t= period of incubation at 37°C (hours)

Fig. 6



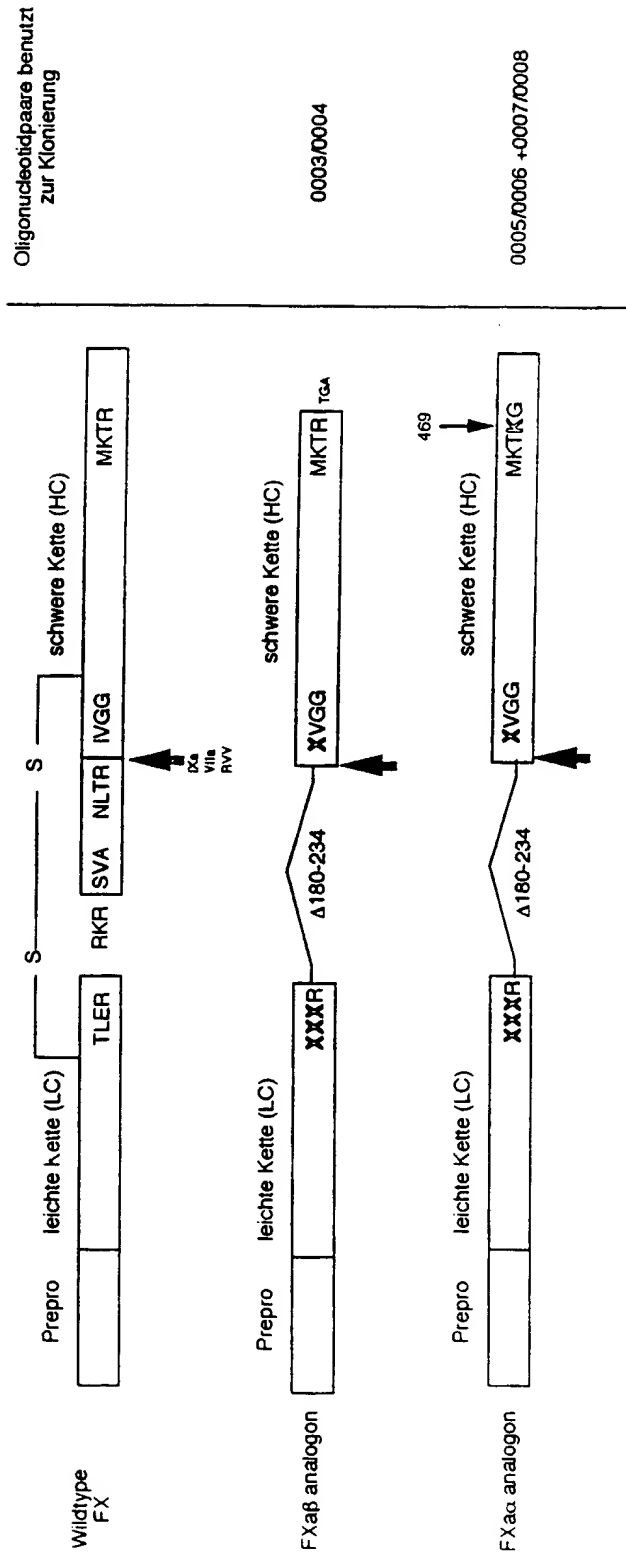


Fig. 7

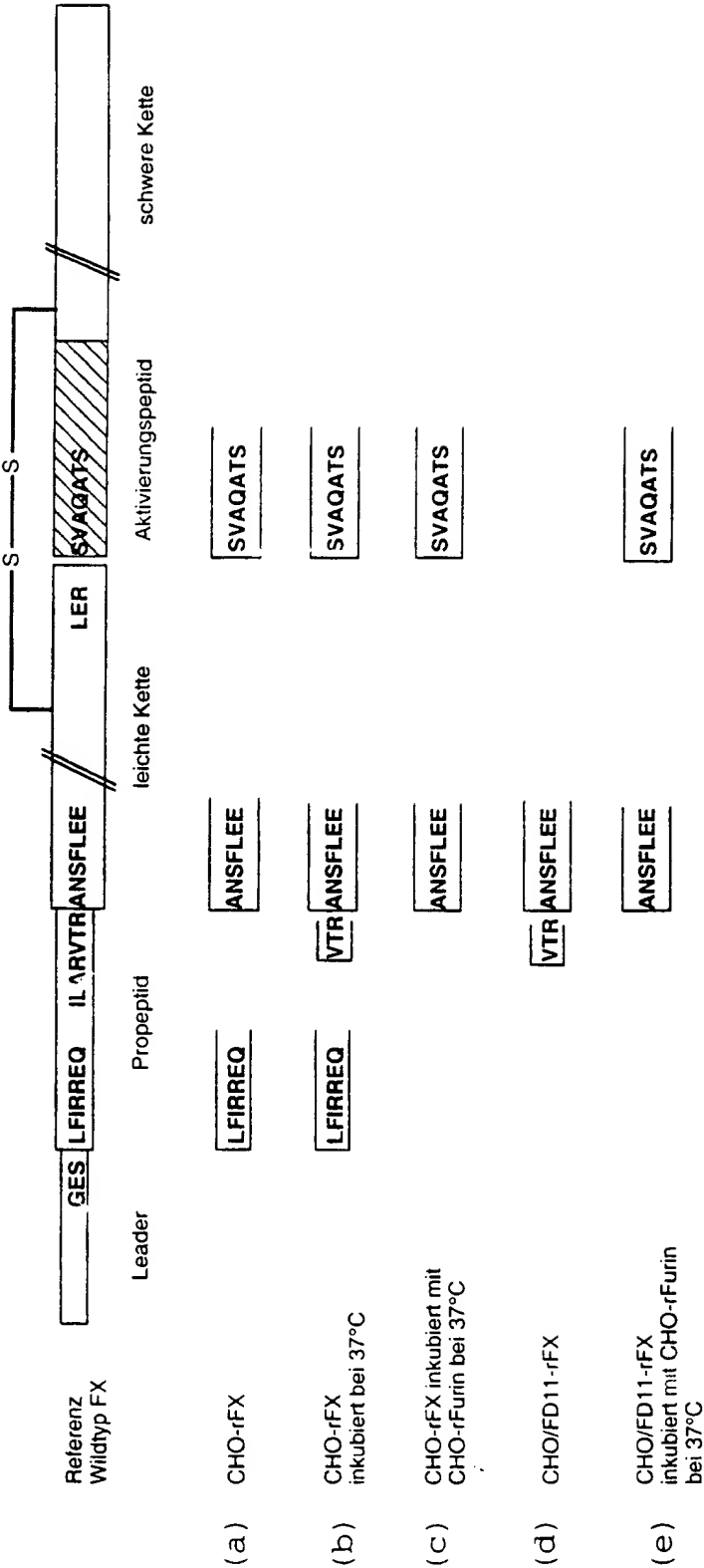
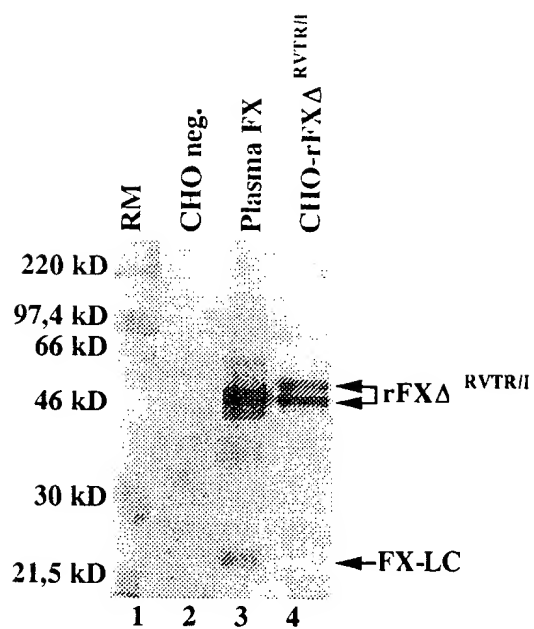
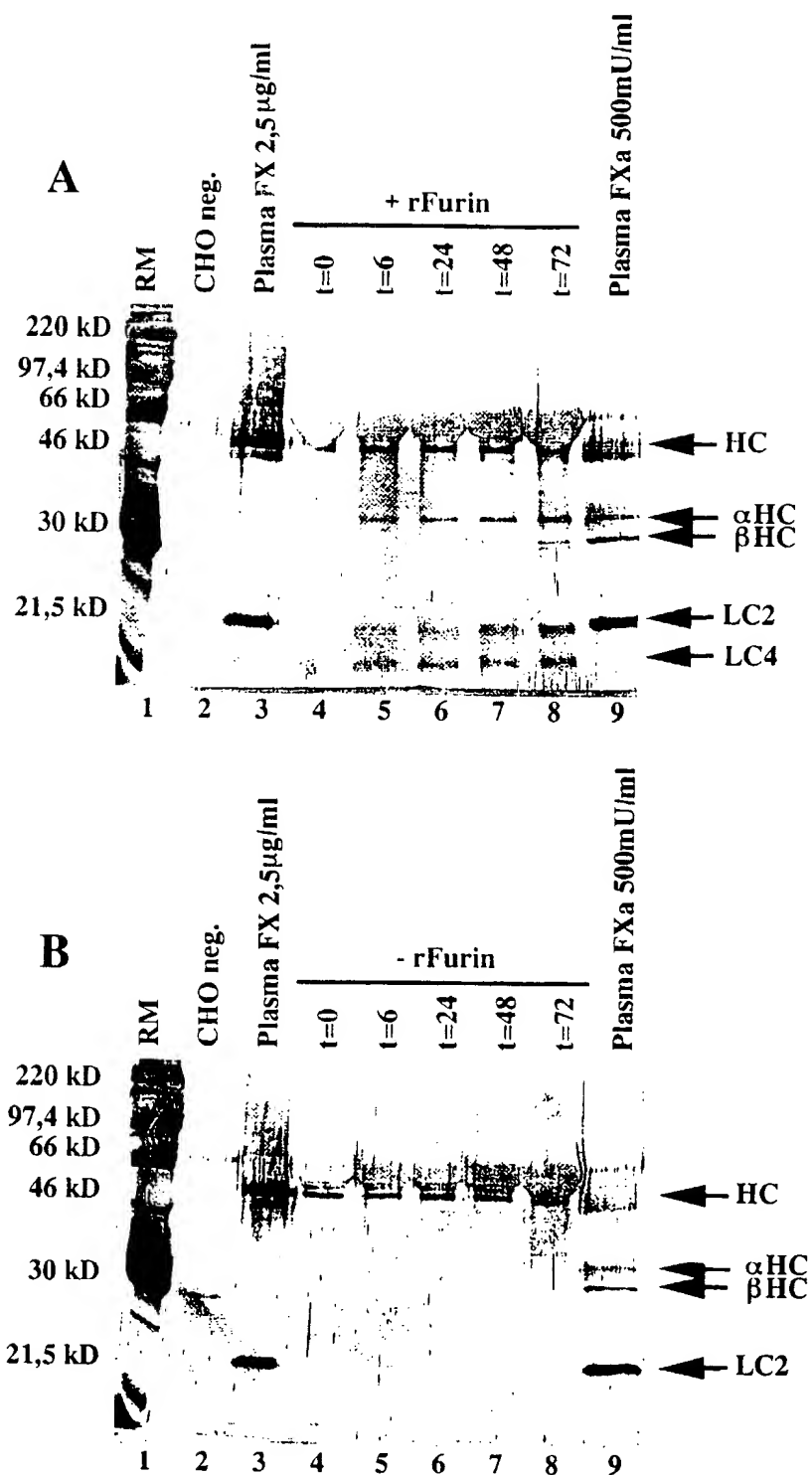


Fig. 8



Figur 9



Figur 10

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/AT 98/00046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/57 C12N9/64 A61K38/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A | WOLF D L ET AL: "Design of constructs for the expression of biologically active recombinant human factors X and Xa. Kinetic analysis of the expressed proteins." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 21, 25 July 1991, MD US, pages 13726-13730, XP002065182 cited in the application | |
| A | LEYTUS S ET AL: "Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein c" BIOCHEMISTRY, vol. 25, no. 18, September 1986, pages 5098-5102, XP002065183 cited in the application | |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 May 1998

Date of mailing of the international search report

04/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00046

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/57 C12N9/64 A61K38/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
|-----------|--|--------------------|

| | | |
|---|--|--|
| A | WOLF D L ET AL: "Design of constructs for the expression of biologically active recombinant human factors X and Xa. Kinetic analysis of the expressed proteins." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 266, Nr. 21, 25. Juli 1991, MD US, Seiten 13726-13730, XP002065182 in der Anmeldung erwähnt | |
|---|--|--|

| | | |
|---|--|--|
| A | LEYTUS S ET AL: "Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein c" BIOCHEMISTRY, Bd. 25, Nr. 18, September 1986, Seiten 5098-5102, XP002065183 in der Anmeldung erwähnt | |
|---|--|--|

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

2 Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht wurde, ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Mai 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/06/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Van der Schaal, C